



Escola de Camins

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria de Camins, Canals i Ports
UPC BARCELONATECH

Tratamiento de agua residual y producción de polímeros con cianobacterias nativas del suelo

Treball realitzat per:

Xavier Eloy Giménez

Dirigit per:

Enrica Uggetti i Dulce Maria Arias

Màster en:

Enginyeria Ambiental

Barcelona, 15/06/2018

Departament d.....

TREBALL FINAL DE MÀSTER

Resum

En un planeta en què la conscienciació ambiental està en augment, la ciència investiga mètodes cada vegada més sostenibles per ocupar un lloc entre els processos i productes que desenvolupem.

En el present treball s'ha experimentat amb cianobacteries a l'hora de tractar aigua residual urbana alhora que s'ha comprovat la producció de bioplàstics i carbohidrats produïts per aquestes. Aquest experiment no és només interessant per estudiar un mètode alternatiu de tractament d'aigües residuals urbanes, si no que, paral·lelament, aquest tractament serveix per alimentar les cianobacteries, que produeixen polímers. Aquesta metodologia ajuda a obtenir no només un aigua tractada, on s'han eliminat tant materia orgànica com nutrients en excés (nitrogen i fòsfor), si no també un producte sostenible que pot substituir el plàstic i als combustibles derivats del petroli.

L'ús d'aquests microorganismes com a tractament terciari no només aporta una solució sostenible als tractaments d'aigües, si no, una solució a la problemàtica dels productes derivats del petroli estesa a tot el món.

Aquests bioplàstics són els polihidroxialcanoats, polímers emmagatzemats en el citoplasma d'alguns bacteris i cianobacteries, com reserves de carboni i energia, en forma de grànuls insolubles en l'aigua.

En el cas dels carbohidrats produïts, poden ser degradats per microorganismes anaerobis i produir biogàs, biodièsel y bioetanol.

A partir d'un cultiu mare de cianobacteris procedents del sòl conreat en un fotobioreactor de 30L, s'han operat 4 bioreactors de 3 L amb diferents temps de retenció hidràulics, el que equival a diferents càrregues de concentració d'entrada.

Com a resultat, s'ha comprovat que els fotobioreactors amb un temps de retenció hidràulic més baix tenen un rendiment d'eliminació de nutrients i de materia orgànica més alt. A més, la menor concentració d'entrada de fòsfor i nitrogen provoca que els cianobacteris produeixin més bioplàstics y carbohidrats que les dels fotobioreactors amb major temps de retenció hidràulic.

Resumen

En un planeta en el que la concienciación ambiental está en aumento, la ciencia investiga métodos cada vez más sostenibles para ocupar un lugar entre los procesos y productos que desarrollamos.

En el presente trabajo se ha experimentado con cianobacteria a la hora de tratar agua residual urbana a la vez que se ha comprobado la producción de bioplásticos y carbohidratos producidos por éstas. Este experimento no es sólo interesante para estudiar un método alternativo de tratamiento de aguas residuales urbanas, sino que, paralelamente, este tratamiento sirve para alimentar las cianobacteria, que producen polímeros. Esta metodología ayuda a obtener no sólo un agua tratada, donde se han eliminado tanto materia orgánica como nutrientes en exceso (nitrógeno y fósforo), sino también un producto sostenible que puede sustituir el plástico y combustibles derivados del petróleo.

El uso de estos microorganismos como tratamiento terciario no solo aporta una solución sostenible a los tratamientos de aguas, si no, una solución a la problemática de los productos derivados del petróleo.

Estos bioplásticos son los polihidroxialcanoatos, polímeros almacenados en el citoplasma de algunas bacterias y cianobacterias, como reservas de carbono y energía, en forma de gránulos insolubles en el agua.

En el caso de los carbohidratos producidos, pueden ser degradados por microorganismos anaerobios y producir biogás, biodiésel y bioetanol.

A partir de un cultivo madre de cianobacterias procedentes del suelo cultivado en un fotobioreactor de 30L, se han operado cuatro bioreactores de 3 L con diferentes tiempos de retención hidráulicos, lo que equivale a diferentes cargas de concentración de entrada.

Como resultado, se ha comprobado que los bioreactores con un tiempo de retención hidráulico más bajo tienen un rendimiento de eliminación de nutrientes y de materia orgánica más alto. Además, la menor concentración de entrada de fósforo y nitrógeno provoca que las cianobacterias produzcan más bioplásticos y carbohidratos que las de los fotobiorreactores con mayor tiempo de retención hidráulico.

Abstract

In a planet where environmental awareness is growing, the company is investigating increasingly sustainable methods to take a place among the processes and products that we develop.

In the present work, cyanobacteria has been used as treating urban waste water experimentation while at the same time, the production of bioplastics, produced by them, has been checked.

In the present work, it has been experimented with cyanobacteria treating urban waste water at the same time as the production of bioplastics and carbohydrates produced by them has been verified. This experiment is not only interesting for studying an alternative method of urban wastewater treatment, but for this time, this treatment is used to feed cyanobacteria, which produces polymers. This methodology helps to obtain not only treated water, where organic matter and excess nutrients (nitrogen and phosphorus) have been eliminated, but also a sustainable product that can replace the plastic and fuels derived from oil.

The use of these microorganisms as tertiary treatment not only provides a sustainable solution to water treatment, but also a solution to the problem of petroleum products.

These bioplastics are polyhydroxyalkanoates, polymers stored in the cytoplasm of some bacteria and cyanobacteria, as carbon and energy reserves, in the form of granules in water.

In the case of the carbohydrates produced, they can be degraded by anaerobic organisms and produce biogas, biodiesel and bioethanol.

From a stem culture of cyanobacteria from the soil grown in a 30 L photobioreactor, four 3 L bioreactors with different hydraulic retention times have been operated, which is equivalent to different inlet concentration loads.

As a result, it has been found that bioreactors with a lower hydraulic retention time have a higher nutrient and organic matter removal. In addition, the lower phosphorus and nitrogen input concentrations causes the cyanobacteria to produce more bioplastics than those of the photobioreactors with higher hydraulic retention time.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a mis compañeros del grupo de investigación GEMMA de la UPC por darme la oportunidad de realizar este proyecto con ellos. Agradecer a Dulce Arias toda la ayuda que me ha brindado, junto con Enrica Uggetti, guiándome día tras día. También a mis compañeros tanto de proyecto como de laboratorio María y Nicolás que han recorrido este camino conmigo y que sin ellos no habría podido realizar este Trabajo. Agradecer a Javier Carretero toda la paciencia y dedicación que tiene cuidando del laboratorio y enseñándonos todos los protocolos seguidos en este trabajo.

Como no, agradecer también a mi familia todo el apoyo desde el primer momento, este trabajo también es suyo.

Tabla de contenido

Abreviaturas.....	9
Introducción.....	9
Cianobacterias	9
Obtención de bioplásticos (PHA)	14
Ficoremediación	19
Eutrofización	21
Objetivo	21
Justificación del trabajo	21
Materiales y Métodos	22
Materiales (falta añadir marca y modelo).....	¡Error! Marcador no definido.
Soluciones.....	¡Error! Marcador no definido.
Químicos (falta añadir marca y pureza)	¡Error! Marcador no definido.
Métodos	¡Error! Marcador no definido.
Fósforo Total	¡Error! Marcador no definido.
Amonio	¡Error! Marcador no definido.
Carbono	¡Error! Marcador no definido.
Sólidos	¡Error! Marcador no definido.
Oxígeno	¡Error! Marcador no definido.
pH	¡Error! Marcador no definido.
Nitrógeno total.....	¡Error! Marcador no definido.
Aniones	¡Error! Marcador no definido.
Carbohidratos y PHAs	¡Error! Marcador no definido.
Demanda Química de Oxígeno.....	¡Error! Marcador no definido.
Clorofila.....	¡Error! Marcador no definido.
Diseño experimental	22
Resultados.....	27
Tratamiento de aguas.....	27
Eficiencia de eliminación	27
Asimilación de nutrientes	37
Producción biomasa.....	49
Producción de polímeros	54
Carbohidratos	54
PHA	55
Discusión	¡Error! Marcador no definido.
Tratamiento de aguas.....	¡Error! Marcador no definido.
Eficiencia de eliminación	¡Error! Marcador no definido.

Asimilación de nutrientes	¡Error! Marcador no definido.
Producción biomasa.....	¡Error! Marcador no definido.
Producción de polímeros	¡Error! Marcador no definido.
Conclusión	56
Tratamiento de aguas.....	¡Error! Marcador no definido.
Eficiencia de eliminación	¡Error! Marcador no definido.
Asimilación de nutrientes	¡Error! Marcador no definido.
Producción biomasa.....	¡Error! Marcador no definido.
Producción de polímeros	¡Error! Marcador no definido.
Carbohidratos	¡Error! Marcador no definido.
PHA	¡Error! Marcador no definido.
Referencias	57

Abreviaturas

[]	concentración
µg	microgramos
d	días
DQO	Demanda Química de Oxígeno
g	gramos
HCl	ácido clorhídrico
IC	carbono inorgánico
Kg	Kilogramos
L	litros
M	Molar [mol/L]
m	metros
min	minutos
mL	mililitros
Mpa	Megapascuales
nm	nanómetros
N	nitrógeno
°C	grados centígrados
P	fosforo
PBR	Packed Bed Reactor
pH	negative 10-base log of the positive hydrogen ion concentration
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
SST	sólidos suspendidos totales
STV	Sólidos totales volátiles
TOC	carbono orgánico total
V	volumen
W	watios

Introducción

Cianobacterias

Las cianobacterias, también conocidas como algas verdeazuladas, son los organismos fotosintéticos más antiguos en la Tierra que se originaron hace aproximadamente 2.6 a 3.500 millones de años, afectan fuertemente la vida en el planeta y han sido organismos cruciales en la evolución de los seres vivos en la tierra.

Las cianobacterias, ancestros de las actuales, fueron las que evolutivamente desarrollaron la fotosíntesis oxigénica, y ese hecho fue un evento único y

determinante en la historia de nuestro planeta, de hecho, se cree que el origen del orgánulo fotosintético en eucariotas posiblemente haya surgido por el proceso de endosimbiosis entre un huésped fagotrófico y una cianobacteria.

Son morfológicamente diversas y existen en diferentes formas, incluyendo unicelulares, filamentosos, planctónicos o bentónicos, y coloniales (cocoides). Son, con mucho, los organismos fotosintéticos más frecuentes, se pueden encontrar cianobacterias virtualmente en todas partes: no solo en aguas continentales o marinas, sino en suelos, aguas termales, tundras muy frías, paredes húmedas de las entradas de las cuevas, charcos, catacumbas, en cubiertas de los barcos, refrigeradores de aires acondicionados, cortinas de ducha, cantos rodados, desagües, cisternas, refrigeradores de centrales nucleares, tundra siberiana, desiertos, hielos antárticos. No solamente tienen unos requerimientos nutricionales muy bajos y se adaptan a utilizar luz de muchas longitudes de onda y a bajas intensidades, sino que también han desarrollado mecanismos de supervivencia en ambientes extremos, en los que hasta hace unos años no se consideraban compatibles con la vida (Sánchez, 2011). Las cianobacterias también son bien conocidas por su capacidad para realizar diferentes modos de metabolismo y la capacidad de cambiar rápidamente de un modo a otro. Todas las cianobacterias son capaces de realizar la fotosíntesis oxigénica, pero algunas especies de cianobacterias pueden pasar a la fotosíntesis anoxygenica dependiente de sulfuro. En condiciones oscuras o anóxicas, las cianobacterias pueden realizar fermentaciones para la generación de energía. Algunas cianobacterias filamentosas han desarrollado células especializadas conocidas como heterocistos para llevar a cabo la fijación de nitrógeno. (Nyok-Sean Lau et al., 2015)

Estos organismos desempeñan un papel relevante como productores primarios a gran escala, además, contribuyen a mantener en la biosfera los ciclos de carbono, oxígeno y nitrógeno. Actúan como sumideros de CO₂ de forma que pueden paliar el calentamiento global, sin embargo, también pueden dar lugar a problemas importantes, como producir floraciones o proliferaciones masivas que pueden provocar problemas sanitarios y medioambientales. En alguna ocasión, estas cianobacterias pueden producir metabolitos secundarios de carácter tóxico para organismos eucariotas, lo que llamamos cianotoxinas.

El uso de la inmovilización para atrapar cianobacterias en matrices (agarosa, carragenina, chitosan, alginato y espuma de poliuretano) puede ayudar a resolver el problema de la cosecha. Además, las cianobacterias inmovilizadas muestran una mayor eficiencia en la eliminación de nutrientes o metales en comparación con su estado libre (Nyok-Sean Lau et al., 2015). La mayoría de estudios previos informan de los diferentes factores que controlan el crecimiento y el predominio de las cianobacterias en ecosistemas de agua dulce, donde su desarrollo depende de complejas interacciones y gran cantidad de factores físico-químicos. Sin embargo todos ellos coinciden en la relación nitrógeno-fósforo y sus niveles de concentración son

factores clave para la capacidad competitiva de las cianobacterias (Arias et al., 2017). Al principio se pensaba que las colonias de cianobacterias necesitaban altas concentraciones de N y P debido a que proliferaban con frecuencia en ecosistemas eutróficos, con amplios rangos de relaciones entre N y P des de 0,5 a 1 (Pick y Lean, 1987). Más adelante se demostró que tienen mayor afinidad para estos dos nutrientes que otros organismos juntamente con una capacidad de almacenamiento importante para éstos (Flores y Herrero, 2014), e incluso, tienen la capacidad de fijar N atmosférico. De esta manera, las cianobacterias son competentes con otras algas en condiciones de limitación tanto de N como de P.

Su producción a gran escala está en auge des de hace cerca de 20 años, gracias a su larga historia de diversificación adaptativa y evolutiva, tienen la capacidad de sintetizar una gran variedad de compuestos bioactivos y otros subproductos valiosos como antibióticos, antifúngicos o antiviruses, así como de asimilar y almacenar glucógeno cianoficina, polifosfatos y polihidroxialcanoatos. Las cianobacterias son organismos cuyo crecimiento tiene unos requerimientos nutricionales muy bajos, con capacidad de obtener por si mismas carbono y nitrógeno en presencia de luz. Esta característica hace que sean especialmente interesantes en biotecnología, debido al bajo costo de la producción de su biomasa (Sánchez, 2011).

Las cianobacterias tienen muchas aplicaciones biotecnológicas que esperan posibles usos en maricultura, alimentos, combustible, fertilizantes, colorantes y la producción de varios metabolitos secundarios, incluyendo toxinas, vitaminas, enzimas y productos farmacéuticos. Teniendo en cuenta los diversos usos potenciales de las cianobacterias en biotecnología. En la tabla 1 se pueden observar varios ejemplos.

Especies de Cianobacteria	Compuestos bioactivos	Actividad biológica
<u>Familia oscillatoriaceae</u>		
<i>Lyngbya majuscula</i>	Malyngolide	Antibacteriano
	Lyngbyatoxins	PKC activador
	Debromoaplysiatoxin	Inflamatorio
	Curacin A	Inhibidores del ensamblaje de microtubulina
	Kalkitoxin	Bloqueadores de canales de sodio
	Cyclic polypeptide	Actividad anti-VIH
<i>L. lagerheimii</i>	Sulfolípido	Actividad anti-VIH
<i>Oscillatoria raoi</i>	Sulfoglico-lípidos acetilados	Antiviral
<i>Phormidium tenue</i>	Galactosyldiacylglycerols	Antialgal

		Anti-VIH
<i>Phormidium spp.</i>	Enzimas termoestables	Catálisis de reacciones
<i>Spirulina platensis</i>	Spirulan	Antiviral
	Ácido gamma linolénico	Predecesor del ácido araquidónico
	Vitamina B y E	Antioxidantes y coenzimas de vitamina B y E
<u>Familia hyellaceae</u>		
<i>Hyella caespitose</i>	Carazostatin	Antifúngico
<u>Familia nostocaceae</u>		
<i>Nostoc spongiaeforme</i>	Nostocine A	Antialgal
<i>N. commune</i>	Nostodione	Antifungal
<i>Nostoc sp.</i>	Nostocyclamide	Antifungal
<i>N. linckia</i>	Cyanobacterina LU-1	Antialgal
<i>N. insulare</i>	Norharmame	Antibacteriano
<i>N.sphaericum</i>	Indolocarbazoles	Antiviral
<i>Anabaena circinalis</i>	Anatoxina-a	Inflamatorio
<u>Familia Scytonemaceae</u>		
<i>Scytonema hofmanni</i>	Cyanobactericina	Antialgal
<i>S. ocellatum</i>	Tolytoxina	Antifungal
	Phytoalexina	
<i>S. pseudohofmanni</i>	Scytophycins	Antifungal
<u>Familia microchaetaceae</u>		
<i>Tolypothrix tenuis</i>	Toyocamicina	Antifungal
<i>T. tjipanasensis</i>	Tjipanazoles	Antifungal
<u>Familia stigonemataceae</u>		
<i>Fischerella muscicola</i>	Fisherellin	Antialgal, antifungal
<i>Hapalosiphon fontinalis</i>	Hapalindole	Antifungal
<u>Familia merismopediaceae</u>		
<i>Gomphosphaeria aponina</i>	Aponin	Antialgal
<u>Familia chroococcaceae</u>		
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Kawaguchipectin B	Antibacteriano
<i>Synechocystis sp.</i>	Naienones A-C	Antitumoral
<i>Synechococcus elongates</i>	Enzima termoestable	Catálisis de reacciones
<i>Thermosynechococcus elongatus BP-1</i>	Polifosfato quinasa termoestable	Producción de dipéptidos

Tabla 1. Compuestos bioactivos de las cianobacterias.

Sin embargo su cultivo no es fácil, ya que, aunque los cultivos puros se sometan a procesos estrictamente controlados y estériles (encareciendo mucho el proceso), éste se contamina con otros tipos de algas (Drosg, 2015).

Factores de crecimiento

Los parámetros que afectan al crecimiento de las cianobacterias son los siguientes (Drosg, 2015) :

- Luz

Tanto la cantidad como la calidad de luz es importante. Necesitan luz con una longitud de onda comprendida entre 400 nm y 700 nm. La intensidad de la luz es determinante para la producción de biomasa, si es demasiado alta puede conducir a la fotoinhibición, siendo incapaces reparar el fotosistema II, que conduce a una pérdida en la actividad fotosintética. La agitación es importante para conseguir una absorción homogénea por parte de todas las células.

- Fuente de carbono

Todos los organismos fotoautótrofos necesitan una fuente de carbono inorgánico. En casi todas las especies, el carbono inorgánico se introduce en forma de hidrogenocarbonato. Las cianobacterias fijan el carbono a través del ciclo de Calvin impulsado por la energía obtenida en la fotosíntesis. Pueden absorber y acumular activamente carbono inorgánico de fuentes externas, lo que les da la capacidad de mantener la fotosíntesis bajo diferentes concentraciones de carbono. El uso del dióxido de carbono como única fuente de carbono para la producción de microalgas no solo es barato, sino que también ofrece una vía para usar este gas como materia prima en vez de emitirlo directamente a la atmosfera.

Es importante controlar la dosificación de CO₂ para evitar un pH desfavorable. La mejor forma de dosificarlo es mediante el uso de aireadores de burbujas pequeñas e inyectándolo solo para mantener un pH correcto.

- Nutrientes

Es necesario controlar la adición tanto de fósforo como de nitrógeno tal y como se ha explicado anteriormente.

- pH

Las cianobacterias no pueden crecer a un pH inferior a 4. El pH influye en la disolución del carbono inorgánico que también afecta el crecimiento de las cianobacterias. Su pH óptimo está entre 7.5 y 10.

- Temperatura

Depende de la cepa con la que se trabaje. Se han reportado temperaturas desde los 4°C hasta los 75°C, aunque la mayoría de estudios hablan de una temperatura óptima de entre 20 y 30°C

Obtención de bioplásticos (PHA)

Los plásticos sintéticos son uno de los mayores inventos de la humanidad y se han convertido en una industria importante y un producto indispensable en la vida humana. Están diseñados de manera que se adapten al rendimiento constante y a las cualidades confiables que se utilizan para una vida útil prolongada, por lo tanto, los hacen inerte a la descomposición natural y química. La durabilidad de estos plásticos desechados contribuye a los problemas medioambientales cuando se convierten en residuos

Como el medio ambiente natural está continuamente contaminado por estos plásticos peligrosos, el desarrollo y la producción de plásticos biodegradables extraídos del medio ambiente se está expandiendo rápidamente para reducir nuestra dependencia de los plásticos sintéticos (Chee et al., 2014).

La actual preocupación por los problemas ambientales, y en particular los causados por la acumulación de plásticos procedentes del petróleo, ha contribuido al desarrollo de alternativas para su reducción, como es la sustitución de éstos por polímeros biodegradables.

Los polímeros biodegradables pueden clasificarse de acuerdo con su origen en: (a) Polímeros sintéticos, (b) Polímeros naturales, y (c) Polímeros microbiológicos (Álvarez-da Silva, 2016).

Entre estos, el polihidroxialcanoato (PHA), que pertenece al grupo de los polioxoésteres, ha recibido una intensa atención debido a que posee propiedades termoplásticas biodegradables.

Los PHAs son los únicos polímeros 100% biodegradables. Pueden considerarse un termoplástico cristalino con propiedades similares a las del polipropileno, es un material biodegradable ideal que puede ser completamente mineralizado en agua y dióxido de carbono por acción de microorganismos naturales. La producción de PHA a partir de CO₂ contribuye a un proceso carbono neutral para la fabricación de plásticos, eso lo hace comercialmente atractivo ya que se produce a partir de una fuente de carbono y energía (luz solar) fácilmente disponible y libre.

El PHA es sintetizado por cianobacterias en condiciones de crecimiento desequilibrado. Se ha encontrado que algunas cianobacterias pueden acumular intracelularmente

polihidroxicanoatos, PHAs, que polimerizan y pueden formar gránulos en el citosol. Los PHAs son material lipídico acumulado por una amplia variedad de microorganismos en presencia de abundantes fuentes de carbono. Éstas son asimiladas y se procesan bioquímicamente en unidades monoméricas de hidroxialcanoato, se polimerizan y luego se almacenan en forma de inclusiones insolubles en agua (o gránulos) en el citoplasma de la célula (figura 1a).

Se ha informado que algunas cianobacterias son capaces de producir PHA hasta en un 90% en peso de células secas durante el agotamiento de nutrientes esenciales como el nitrógeno, el fósforo o el magnesio. No solo sirve como compuestos de almacenamiento de carbono y fuentes de energía, sino también como sumidero para reducir equivalentes para algunos microorganismos. Actúa como un compuesto de almacenamiento ideal debido a su insolubilidad dentro del citoplasma bacteriano, que ejerce un aumento insignificante en la presión osmótica. Se demostró que las bacterias que contienen materiales de almacenamiento de PHA podrían sobrevivir durante el período de inanición en comparación con aquellos sin PHA, ya que este material de reserva de energía ralentiza la autólisis celular y, posteriormente, su mortalidad.

Dependiendo de las condiciones de cultivo que favorecen la acumulación de PHA, las bacterias que se usan para la producción de PHA se pueden clasificar en dos grupos. El primer grupo de bacterias requiere la limitación de nutrientes esenciales como nitrógeno, oxígeno y la presencia de una fuente de carbono en exceso para la síntesis eficiente de PHA. Las bacterias representativas que pertenecen a este grupo incluyen *C. necator*, *Protomonas extorquens* y *Protomonas oleovorans*. Por otro lado, el segundo grupo de bacterias no requiere limitación de nutrientes para la síntesis de PHA y puede acumular PHA durante la fase de crecimiento exponencial (Chee et al., 2014). En este trabajo se ha estudiado la producción de PHA con el primer grupo.

Las vías de biosíntesis de PHA están intrincadamente relacionadas con las vías metabólicas centrales de la bacteria, incluida la glucólisis, el ciclo de Krebs, la β -oxidación, la síntesis de ácidos grasos, el catabolismo de aminoácidos, el ciclo de Calvin y la vía de la serina.

Muchos intermediarios comunes también se comparten entre el PHA y estas vías metabólicas, sobre todo el acetil-CoA.

En condiciones ricas en nutrientes, la producción de altas cantidades de coenzima A del ciclo Krebs bloquea la síntesis de PHA al inhibir la 3-ketotiolasa (PhaA) de modo que el acetil-CoA se canaliza al ciclo Krebs para la producción de energía y el crecimiento celular.

En condiciones de nutrientes desequilibradas (es decir, cuando un nutriente esencial como nitrógeno y fósforo es limitante en presencia de exceso de carbono), los niveles

de coenzima A no son inhibitorios, lo que permite que el acetil-CoA se dirija hacia las vías sintéticas de carbohidratos y PHA para su acumulación. Esta estrategia de regulación metabólica a su vez permite que los microbios que acumulan PHA maximicen los recursos de nutrientes en su adaptación a las condiciones ambientales (Tan et al., 2014).

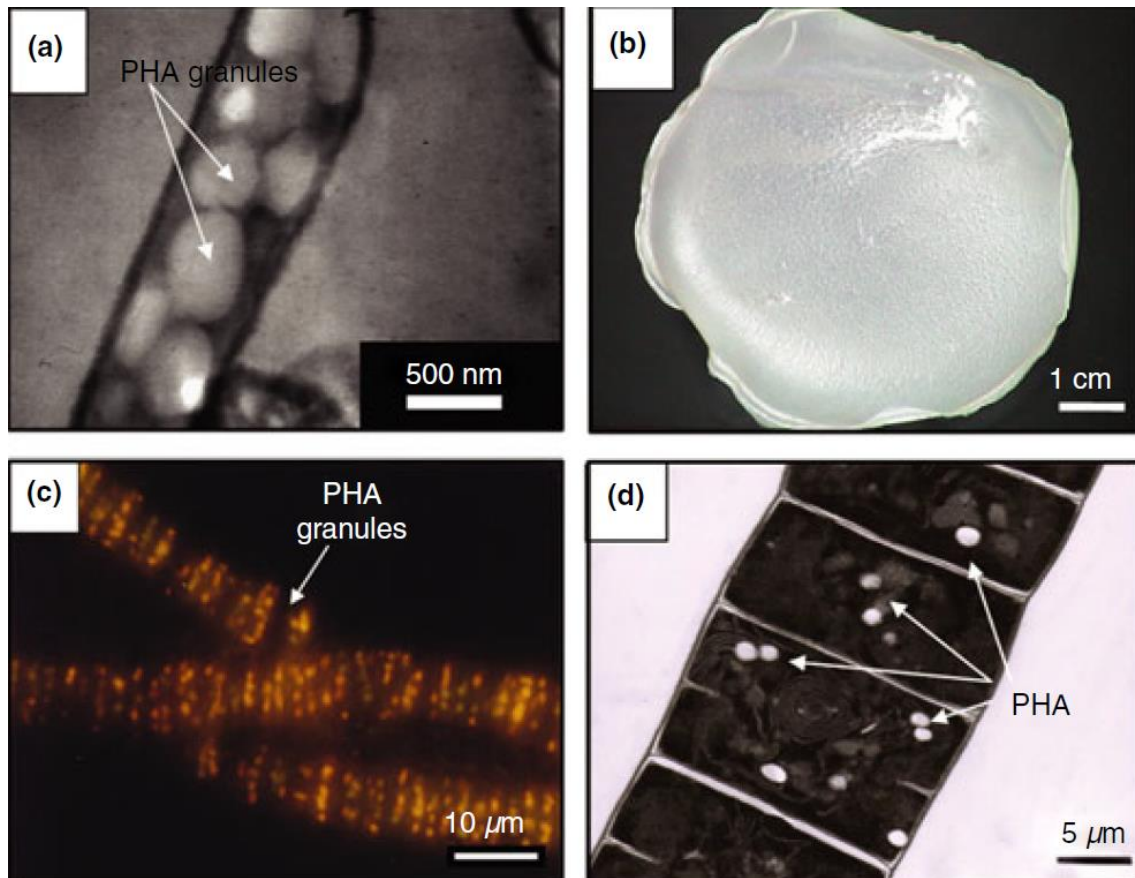


Figura 1. Polihidroxialcanoatos (PHA) en microorganismos. (a) Micrografía electrónica de transmisión (TEM) de gránulos de PHA en una célula de cianobacteria. (b) Emisión de película de PHA del solvente. (c) Gránulos de PHA acumulados por *Spirulina platensis* teñidos con Azul de Nilo A. Los gránulos de PHA aparecen como partículas de color naranja brillante en el citoplasma de la célula cuando se observan con un microscopio de fluorescencia. (d) Micrografía electrónica de transmisión que muestra los gránulos discretos de PHA acumulados en el citoplasma de *S. platensis*. (Fuente: Abed et al, 2009)

En estos momentos el PHA se produce en grandes fermentadores por bacterias heterótrofas. Para estos procesos de fermentación, son necesarias grandes cantidades de fuentes de carbono orgánico como la glucosa, que representan aproximadamente el 50% de los costes de producción totales (Troschl et al., 2017). Una forma alternativa de producir PHA es el uso de algas procariotas, mejor conocidas como cianobacterias. Algunas cepas de cianobacterias pertenecientes a los géneros *Spirulina* y *Synechocystis*, han mostrado acumulación de hasta un 7% de PHAs referido a peso seco (Abed et al, 2009).

Dado que el PHA es un producto intracelular, el método aplicable para la separación efectiva de éste de otros componentes de la biomasa puede ser complejo y costoso. El método más común para su extracción de la biomasa es la extracción del solvente mediante el uso de cloroformo. La extracción con cloroformo es un método muy simple y efectivo para separar los gránulos de PHA de la biomasa. Al usar este método, se puede obtener PHA altamente purificado sin la degradación de las sus moléculas. Otros disolventes de hidrocarburos halogenados como diclorometano, dicloroetano y cloropropano también pueden utilizarse para extraer y purificar PHA de la biomasa celular. Sin embargo, estos métodos no son adecuados para la producción masiva de PHA ya que el solvente es potencialmente peligroso para la salud y el medio ambiente.

Además de la extracción con solvente, otro método simple y efectivo que se ha empleado para recuperar PHA es la lisis celular mediante el uso de hipoclorito de sodio. En este método, la biomasa celular se trata inicialmente con solución de hipoclorito de sodio antes de que los gránulos de PHA se aislen de los restos celulares mediante centrifugación. El uso de hipoclorito de sodio para extraer PHA de la biomasa siempre da como resultado una degradación grave de PHA y produce PHA con un peso molecular más bajo (M_w). Por el contrario, el uso de pretratamiento con tensioactivo para recuperar PHA da como resultado una pureza menor pero menos degradación de M_w .

Se puede obtener PHA con un peso molecular razonablemente alto rápidamente usando el método surfactante-hipoclorito en comparación con otro tratamiento, como la extracción a base de solvente. Las regulaciones del peso molecular del PHA son posibles para controlar la velocidad de degradación de este polímero. Tras el desarrollo en nanotecnología, el PHA de tamaño nanométrico se penetró profundamente en los tejidos corporales seleccionados y se demostró que el PHA tiene una buena eficacia de absorción por parte de las células.

El PHA tiene una amplia gama de aplicaciones potenciales debido a sus características deseadas, como la biocompatibilidad, la biodegradabilidad y la citotoxicidad insignificante de las células. Por lo tanto, la aplicación potencial de PHA como reemplazo de polímeros basados en petroquímicos está ganando popularidad en diversos campos que involucran empaques, materiales médicos y de recubrimiento. Estas propiedades deseables en la composición y la mezcla han ampliado sus resultados como posibles aplicaciones de uso final. El PHA ha sido fabricado para, películas de polímeros, suturas y productos farmacéuticos utilizados en cirugía, transplantología, ingeniería de tejidos y farmacología. En ingeniería de tejidos, las células se cultivan in vitro en polímeros biodegradables para construir "tejidos" con fines de implantación. Por lo general, se necesita un alto nivel de biocompatibilidad antes de que se puedan incorporar materiales extraños en el cuerpo humano. La

forma, la porosidad superficial, la química de los materiales y el entorno tisular desempeñan un papel importante en la biocompatibilidad. El PHA tiene una clara ventaja en el campo médico sobre la silicona, un polímero tradicionalmente utilizado, que se cree que tiene efectos difamatorios y contribuye al crecimiento de las células cancerosas. Aunque el PHA puede servir como biomateriales sustitutos para la silicona, deben cumplirse cinco elementos clave para la aplicación exitosa de éste en ingeniería tisular, es decir, biocompatibilidad, soporte del crecimiento celular y adhesión celular, que guíe y organice las células, que permita el crecimiento de las células y que permita el paso de nutrientes y productos de desecho, y finalmente que sea biodegradable sin producir ningún compuesto dañino.

Recientemente, el PHA también se ha estudiado para su aplicación como película cosmética de transferencia de aceite. Se descubrió que también absorbe y retiene el aceite rápidamente; y simultáneamente también actúa como un indicador de petróleo. La propiedad biocompatible de PHA lo hace muy adecuado para productos de cuidado de la piel. Otra aplicación emergente del PHA es como fuente potencial de ácidos orgánicos en la alimentación animal. Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) también se han utilizado como un nuevo biocontrol y agente antimicrobiano en la producción animal (Chee et al., 2014).

Carbohidratos

Las cianobacterias poseen la capacidad única de producir hidrocarburos de forma natural a partir de ácidos grasos, pero no todas logran esto a través de la misma vía metabólica. Una vía comprende una conversión en dos etapas de ácidos grasos primero a aldehídos grasos y luego alcanos que implican una acil reductasa de acil graso (FAAR) y aldehído deformilante de oxigenasa (ADO). El segundo implica una ruta de policétido sintasa (PKS) que primero alarga la cadena de acilo seguida de descarboxilación para producir un alqueno terminal.

Un rasgo menos bien caracterizado y potencialmente de gran importancia social es su capacidad universal para producir hidrocarburos de cadena larga. El primer reconocimiento de este último rasgo fue el resultado de las investigaciones en la década de 1960 y fue importante en el contexto de la identificación del origen de los hidrocarburos encontrados en depósitos sedimentarios y de petróleo. En los últimos años, ha habido un creciente reconocimiento de los impactos ambientales negativos del uso continuo de combustibles fósiles, así como una demanda de energía mundial cada vez mayor, y estos hechos se han combinado para aumentar el interés en el desarrollo de biocombustibles sostenibles como los hidrocarburos de las cianobacterias. Se pueden contemplar muchas fuentes de energía renovable para ayudar a satisfacer la demanda de energía eléctrica de la sociedad, sin embargo, sigue

existiendo una gran necesidad de combustibles líquidos de bajo costo, en particular gasolina, diesel y combustible para aviones. La calidad del combustible diésel y de aviación se mide utilizando valores de cetano, mientras que las clasificaciones de octano son la medida principal de la calidad de la gasolina. La calidad del combustible está determinada en gran medida por la estructura de los hidrocarburos en el combustible y el tipo de combustible que se está considerando. Los hidrocarburos saturados de cadena lineal largos exhiben mayores valores de cetano, mientras que las moléculas cortas altamente ramificadas exhiben índices de octano superiores. Es importante considerar estas características estructurales cuando se evalúa la aplicabilidad de varias moléculas de biocombustible a diferentes aplicaciones del motor. En este contexto, los hidrocarburos comúnmente observados de las cianobacterias, incluidos el heptadecano y el metilheptadecano, son candidatos prometedores para las aplicaciones de combustible diesel (Coates et al., 2014).

Ficoremediación

La ficoremediación es el uso de algas para la eliminación o biotransformación de contaminantes del agua residual, incluidos nutrientes y xenobióticos, de aguas residuales y CO₂ del aire residual (Talukder et al., 2015). El empleo de esta tecnología en el tratamiento de aguas residuales presenta una alternativa práctica actual de utilizar métodos convencionales, incluidos métodos físico-químicos. A partir de la idea de que las algas transforman contaminantes en materiales no peligrosos, y que permitan que el agua tratada se reutilice o se descargue de forma segura, ha provocado numerosos estudios acerca de la aplicación de este organismo en cultivos intensivos destinados al tratamiento biológico terciario.

Las cianobacterias tienen un alto potencial como organismos que pueden contribuir a resolver algunos problemas de contaminación o desequilibrios ambientales, ellas solas o en sinergia con otros organismos tienen la capacidad de degradar un alto número de compuestos orgánicos xenobioticos que pueden alterar nuestro medio ambiente.

En la era del calentamiento global, el cambio climático y la emisión de carbono, existe una gran preocupación sobre el aumento de los niveles de dióxido de carbono, además de la laboriosa tarea de tratar los desechos que contienen contaminantes. Las cianobacterias son una interesante alternativa para el tratamiento de aguas residuales (Hall et al, 1995). Como usan dióxido de carbono como fuente de carbono, pueden crecer fotoautótroficamente sin la adición de una fuente de carbono orgánico. Consideradas como fábricas de células verdes no solo son buenos carroñeros de productos químicos tóxicos, sino que también participan en la oxigenación de la atmósfera y el secuestro de dióxido de carbono, lo que los convierte en mejores candidatos entre los sistemas de biorremediación.

Asimilan una cantidad significativa de nutrientes porque requieren altas cantidades de nitrógeno y fósforo para la síntesis de proteínas (45-60% del peso seco de microalgas), ácidos nucleicos y fosfolípidos. La eliminación de nutrientes también puede incrementarse mediante la eliminación de NH_3 o la precipitación de P debido al aumento del pH asociado con la fotosíntesis. Además, la phycoremediación tiene ventajas sobre otros métodos fisicoquímicos convencionales, como el intercambio iónico, la ósmosis inversa, la diálisis y la electrodiálisis, la separación de membranas, la adsorción de carbón activado y la reducción u oxidación química, debido a su mejor eficacia de eliminación de nutrientes y el bajo costo de su implementación y mantenimiento.

Algas verdes unicelulares como *Chlorella* spp. y *Scenedesmus* spp. han sido ampliamente utilizados en el tratamiento de aguas residuales, ya que a menudo colonizan los estanques de forma natural y tienen altas tasas de crecimiento y altas capacidades de eliminación de nutrientes. Ofrecen un enfoque económico y eficaz para eliminar el exceso de nutrientes y otros contaminantes en el tratamiento terciario de aguas residuales, al tiempo que producen biomasa potencialmente valiosa, debido a su alta capacidad de absorción de nutrientes inorgánicos (Rao et al., 2011).

Con referencia a las cianobacterias, cultivos de *Oscillatoria* sp. BDU 30501, *Aphanocapsa* sp. BDU 16 y una bacteria halófila *Halobacterium* US 101 se usaron para tratar un efluente de fábrica y dieron como resultado la reducción de calcio y cloruro a niveles que no afectaron a la supervivencia y la multiplicación de peces. *Phormidium valderianum* BDU 30501 se usó para reducir las concentraciones de fenol, mientras que *Oscillatoria boryana* BDU 92181 se usó para eliminar el pigmento de melanoidina de los efluentes de la destilería. Otras cepas también han mostrado alta eficacia en industrias textiles o papel impreso degradando colorantes sintéticos, como rojo de metilo, fucsina básica utilizados que son muy tóxicos para el medio ambiente y carcinogénicos. *Anabaena* sp. PCC 7120 y *Nostoc ellipsosporum* tienen la propiedad de degradar lindano (Kuritz y Wolk, 1995). Nuestros ríos contienen una alta concentración de fármacos procedentes del alcantarillado debido a los vertidos de las industrias farmacéuticas, entre ellos antibióticos. Afortunadamente, algunas cianobacterias como por ejemplo *Phormidium valderianum* BDU, son capaces de utilizar ciertos antibióticos como fuente de nitrógeno, degradándolos al utilizarlos (Sánchez, 2011).

Las cianobacterias se caracterizan también por su habilidad para oxidar componentes del petróleo, compuestos orgánicos complejos, e iones metálicos acumulados como el zinc o el cobre. Uno de los puntos en contra de esta aplicación es la dificultad en separar la biomasa antes del vertido.

Eutrofización

La eutrofización es un proceso que emerge a raíz de un exceso de nutrientes en ríos, lagos, embalses, etc., que rompe el equilibrio del ecosistema. Es consecuencia de los procesos de contaminación de las aguas, principalmente por los vertidos con alta contaminación de nitrógeno y fósforo procedentes de los retornos urbanos, instalaciones industriales y el uso de pesticidas y fertilizantes.

Como consecuencia de este proceso es el incremento de vegetación y otros organismos que provocan el agotamiento de oxígeno del agua provocando ausencia de vida en ella.

Al eliminar los excesos de nutrientes mediante el cultivo de biomasa, tal y como se estudia en este trabajo, se elimina la posibilidad de que se de un proceso de eutrofización.

Las características más comunes consecuencia del proceso de eutrofización son el mal olor debido a la alta cantidad de materia orgánica que aporta la biomasa al morir, la ausencia de peces debido a la gran cantidad de oxígeno disuelto consumido, y la poca calidad de las aguas.

Objetivo

El objetivo del presente trabajo ha sido determinar la eficiencia de un cultivo mixto, con mayoría de cianobacterias extraídas del suelo y cultivadas en agua residual en fotobioreactores de 3L, tanto para el tratamiento de aguas urbanas como para la producción de polímeros, trabajando con diferentes tiempos de retención hidráulicos. Con referencia al tratamiento de agua, se compararán los resultados obtenidos con la legislación vigente de depuración para determinar si el trabajo realizado permite obtener un agua con los parámetros adecuados.

Por lo que concierne la producción de polímeros, se extraerán y cuantificarán los polihidroxialcanoatos (PHAs) así como los carbohidratos obtenidos a partir de cianobacterias cultivadas en aguas residuales, y se compararán los datos obtenidos con los de otros estudios previos.

Justificación del trabajo

Vivimos en una época en la cual los productos y procesos sostenibles tienen mucha importancia. A medida que el tiempo pasa y que el medio ambiente cada vez está más contaminado, cada vez es más necesario el desarrollo de éstos. Este trabajo, el cual ha sido desarrollado con cianobacterias procedentes del suelo (figura 2.), es otra búsqueda de la sostenibilidad, no solo de un proceso como puede ser el tratamiento

de aguas residuales, si no también de un producto, ya que paralelamente se producen bioplásticos a partir de la biomasa. Es decir, no solo se eliminan los contaminantes del agua, si no que se convierten en materia prima para la obtención de un producto que puede llegar a substituir los plásticos actuales que tanto contaminan. Este tipo de cianobacterias no han sido demasiado estudiadas ni para el tratamiento de aguas residuales ni para la producción de polímeros a partir del sustrato procedente de este tipo de aguas. Es por estos motivos que se decide estudiar y determinar la eficiencia tanto de eliminación de contaminantes como de producción de bioproductos.



Figura 2. Cianobacteria procedente del suelo utilizada en este trabajo.

Materiales y Métodos

Diseño experimental

Cultivo base

Para obtener el cultivo que se usó en los experimentos, las cianobacterias obtenidas del suelo se hidrataron y agitaron en un Erlenmeyer con medio de crecimiento BG-11 (apartado Medios) durante dos días. El cultivo consistía en un cultivo mixto de cianobacterias fijadoras de nitrógeno del género *Nostoc sp.*, *Oscillatoria sp.*, *Tolypothrix sp.* Y *Pseudanabaena sp.* Una vez la biomasa estuvo suspendida, ésta se

inoculó en un fotobioreactor (PBR) localizado en las instalaciones del grupo GEMMA del departamento de Ingeniería Civil y Ambiental de la Universitat Politècnica de Catalunya. El reactor consistía en un tubo cilíndrico hecho de metacrilato de polimetilo de 5 mm de grosor con un volumen total de 35,8 L y un volumen de trabajo de cultivo de 30 L.

El reactor fue mantenido con medio de crecimiento BG-11 sin nitrógeno con el fin de mantener un cultivo dominado por fijadoras de nitrógeno.

Para el mantenimiento del cultivo se emplearon ciclos de luz alternados con períodos oscuros de 12 horas. Durante la fase lumínica se utilizó una lámpara de halógenos metálicos externos de 600W equipada con un balasto digital (modelo 5500k, Sunmaster, EE.UU.) colocada a una distancia de 70 cm del PBR. Este tipo de lámpara promueve la radiación fotosintética activa, ya que trabaja con un espectro de longitud de onda de entre 380 a 780 nm, proporcionando $204 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, que corresponde a la irradiancia recomendada para mejorar la actividad de las algas ($200\text{-}400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

El pH del cultivo se mantuvo a un pH de 7,5 y controlado constantemente mediante adiciones automáticas de HCl 0,1 M y NaOH 0,1 M, mediante un controlador HI 8711, HANNA (EE.UU.) e inyecciones de CO_2 .

El control de la inyección de CO_2 , el controlador de HCl y NaOH, las bombas de alimentación y recolección de cultivos, así como la monitorización de la temperatura, la luz y el pH se controlaron y registraron mediante el uso del software LabVIEW®.



Figura 4. Imágenes del fotobioreactor en donde se criaba el cultivo base.

Experimentación

Los experimentos de tratamiento de aguas y producción de PHA se desarrollaron en 4 fotobiorreactores de 3 L (volumen útil), a saber: M1, A1, T1 y T2. Todos ellos tenían un volumen inicial de 2,5 L de cultivo y se alimentaron de manera semicontinua.

Fueron operados con un tiempo de retención hidráulico (TRH) propio: para M1 y A1 el TRH fue de 10 d, para T1 fue de 8 d y para T2 de 6 d. A1 tenía la particularidad de que a la hora de alimentarlo, se diluía el agua residual en agua destilada con una proporción de 1:1. El período total de la experimentación era equivalente a tres veces el TRH de cada reactor.

La alimentación era diaria y consistía en la previa extracción de cultivo de volumen equivalente a la adición de agua residual para poder mantener el mismo volumen y cumplir con los tiempos de retención determinados.

El cultivo extraído se utilizó para analizar los parámetros objetivo de los experimentos y poder obtener datos para ver la evolución.

Los parámetros analizados fueron los siguientes:

- Fósforo total: concentración de fósforo tanto en el efluente como en la entrada. Se analizó tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes).

Para saber el Fósforo real se le restó la biomasa ya que en la metodología, para obtener sus valores, no se filtraba. Para obtener el valor de biomasa se partió de una fórmula teórica de biomasa (C106N16P1) y se realizó un factor de conversión para obtener la relación carbono-nitrógeno de la molécula de biomasa:

$$\frac{P}{C}: \frac{31 \text{ g/mol}}{12 \text{ g/mol}} \times \frac{1 \text{ mol P}}{106 \text{ mol C}} = 0,02437$$

Una vez obtenido este valor, éste se multiplicaba por el TOC de biomasa, calculado de la siguiente manera:

$$(\text{TOC Total} - \text{TOC Soluble}) * 0.8$$

Al TOC Total se le restaba el TOC soluble para obtener el TOC insoluble que es en gran parte biomasa. Se le aplica un factor de corrección del 0,8 ya que de media el 20% del TOC insoluble son sólidos de la propia agua residual, según se ha podido comprobar a través de las analíticas de SST y STV.

Una vez obtenido el valor de fósforo procedente de la biomasa, éste se le restaba al fósforo total para obtener el valor total real, sin biomasa.

El valor de fósforo inorgánico se obtiene a partir de las lecturas de los ortofosfatos (PO₄³⁺), y mediante factores de conversión con los pesos moleculares del oxígeno y del fósforo, se obtienen los valores de fósforo inorgánico.

El fósforo orgánico es el resultado de la diferencia entre fósforo total y el inorgánico.

- Nitrógeno total: concentración de nitrógeno tanto en el efluente como en la entrada. Se analizó tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes).

Para saber el Nitrógeno real se le restó la biomasa ya que en la metodología, para obtener sus valores, no se filtraba. Para obtener el valor de biomasa se partió de una

fórmula teórica de biomasa (C106N16P1) y se realizó un factor de conversión para obtener la relación carbono-nitrógeno de la molécula de biomasa:

$$\frac{N}{C}: \frac{14 \text{ g/mol}}{12 \text{ g/mol}} \times \frac{1 \text{ mol N}}{16 \text{ mol C}} = 0,1761$$

Una vez obtenido este valor, éste se multiplicaba por el TOC de biomasa, calculado de la siguiente manera:

$$(\text{TOC Total} - \text{TOC Soluble}) * 0.8$$

Al TOC Total se le restaba el TOC soluble para obtener el TOC insoluble que es en gran parte biomasa. Se aplica un factor de corrección del 0,8 ya que de media el 20% del TOC insoluble son sólidos de la propia agua residual, según se ha podido comprobar a través de las analíticas de SST y STV.

Una vez obtenido el valor de nitrógeno procedente de la biomasa, éste se le restaba al nitrógeno total para obtener el valor total real, sin biomasa.

El valor de nitrógeno orgánico es el sumatorio del nitrógeno contenido en las moléculas de nitrito, nitrato y amonio. Éste valor se obtiene mediante factores de conversión teniendo en cuenta los pesos moleculares de cada elemento.

El nitrógeno orgánico se obtiene mediante la diferencia entre nitrógeno total e inorgánico.

- Amonio: concentración de amonio tanto en el efluente como en la entrada. Este parámetro junto con los valores de nitritos y nitratos permitieron calcular las diferentes formas de nitrógeno del medio. Se analizó tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes).
- Carbono: concentración de carbono total, orgánico e inorgánico tanto en el efluente como en la entrada. Se analizó tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes).
- Sólidos suspendidos/volátiles totales: concentración de sólidos tanto volátiles como suspendidos tanto en el efluente como en la entrada. Este parámetro ayudaba a distinguir entre biomasa y sólidos procedentes del agua residual. Se analizaron tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes).
- Oxígeno: concentración de oxígeno en el reactor, se debía controlar para mantener las condiciones óptimas de entorno para la biomasa. Se midió tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes).
- pH: concentración de protones tanto en el efluente como en la entrada, se debía controlar para mantener las condiciones óptimas de entorno para la biomasa. Se midió cada día a través de los pHmetros instalados.
- Aniones: concentración de ortofosfatos, nitritos y nitratos tanto en el efluente como en la entrada. Se analizaron tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes).
- Carbohidratos y PHAs: concentración de PHAs y carbohidratos producidos en el reactor. Se analizaron dos veces por semana (lunes y viernes).
- DQO: concentración de cantidades susceptibles de ser oxidadas por medios químicos que hay disueltas tanto en el efluente como en la entrada. Permite valorar la contaminación del medio. Se analizó tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes).

- Clorofila: concentración de clorofila en el reactor, permitía valorar la cantidad de algas comprendidas en la biomasa. Se analizó dos veces por semana (lunes y jueves)
- Carga (Lv): Para estudiar la aportación de nutrientes se calcula la carga (Lv), dependiendo del TRH de cada reactor el volumen de entrada será diferente:

$$Lv = \frac{[\text{entrada}] * V \text{ entrada}}{V \text{ reactor}}$$

Los protocolos utilizados para calcular estos parámetros se encuentran en el anexo.

El programa de alimentación y extracción era el siguiente:

Reactor	Adición de agua residual	Extracción de muestra
A1	Lunes y viernes: 200 mL agua residual + 200 mL agua destilada	Lunes y viernes: 400 mL
	Martes, miércoles y jueves: 100 mL agua residual + 100 mL agua destilada	Martes, miércoles y jueves: 200 mL
M1	Lunes y viernes: 400 mL	Lunes y viernes: 400 mL
	Martes, miércoles y jueves: 400 mL	Martes, miércoles y jueves: 400 mL
T1	Lunes y viernes: 500 mL	Lunes y viernes: 500 mL
	Martes, miércoles y jueves: 250 mL	Martes, miércoles y jueves: 250 mL
T2	Lunes y viernes: 666 mL	Lunes y viernes: 666 mL
	Martes, miércoles y jueves: 333 mL	Martes, miércoles y jueves: 333 mL

Tabla 5. Programa de adiciones y extracciones diarias para alimentar y obtener cultivo para analíticas de los diferentes reactores

La correcta mezcla completa del reactor se logró mediante la inyección continua de aire mediante un burbujeador de aire colocado en la parte inferior del reactor.

El pH se controló continuamente mediante adiciones de HCl 0,1 M mediante una bomba conectada al pHmetro, éste tenía un valor límite de pH de 7,5. El hecho de inyectar ácido provocaba una subida del volumen del cultivo.

El reactor fue operado con una fase lumínica de 12 horas mediante dos lámparas por reactor con bombillas de 50 W.



Figura 5. Imagen de los fotobiorreactores usados para el tratamiento de aguas.

Resultados

Tratamiento de aguas

En esta parte del trabajo se presentan los resultados obtenidos del apartado de la experimentación referida al tratamiento de aguas. Los resultados se dividen en dos grupos, uno para A1 y M1, y otro para T1 y T2, ya que se realizaron en momentos diferentes y con una entrada de agua residual también diferente.

Eficiencia de eliminación

Para visualizar los datos obtenidos se han dibujado las evoluciones temporales de cada elemento y para cada entrada.

- Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Para representar la eliminación de la DQO se han graficado los valores de DQO total para las entrada y de DQO soluble para los reactores, ya que en el proceso de tratamiento de aguas residuales la materia orgánica de la entrada se solubiliza y se consume por las bacterias.

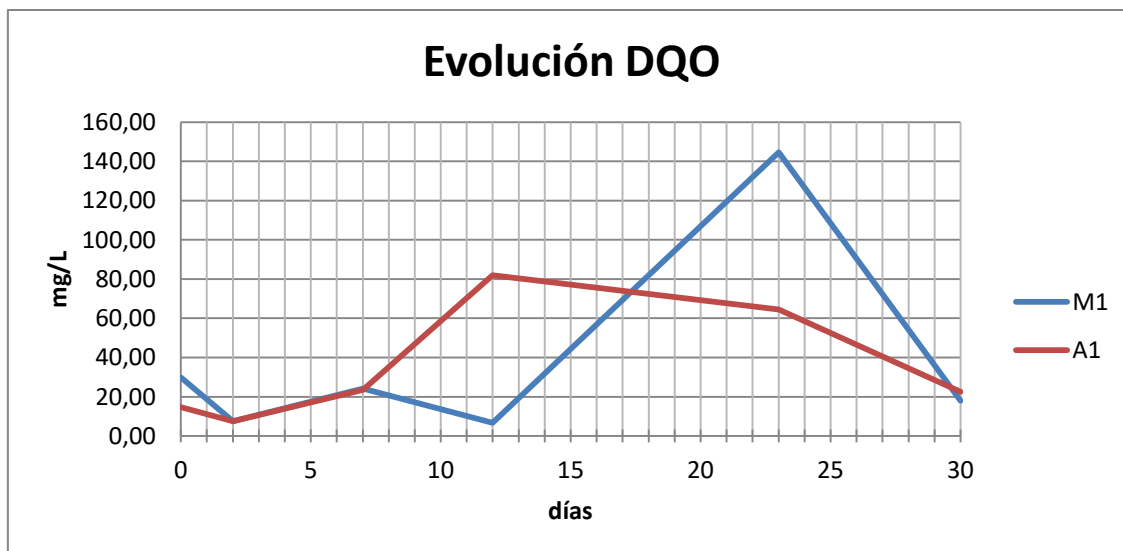


Figura 5. Evolución de la DQO de los reactores A1 y M1.

El agua residual que alimenta los reactores aumenta en concentración de DQO con concentraciones muy altas de 730 mg/L y 2429 mg/L. En la figura 5 se ve que para A1 se va incrementando la concentración hasta valores de 80 mg/L en el doceavo día, cuando ésta empieza a disminuir, observándose una tendencia de eliminación de DQO soluble aunque la entrada llegue con alta carga. La tendencia en M1 es algo diferente, el reactor amortigua bien la carga añadida que va en aumento, obteniéndose concentraciones estables alrededor de los 25 mg/L, hasta que en el doceavo día, cuando la carga de la entrada aumenta, la concentración en el reactor aumenta hasta casi los 150 mg/L. Una vez se llega a este valor, la concentración disminuye.

Una vez obtenidos los valores de DQO para cada reactor, se observa la evolución de los rendimientos de eliminación de los reactores. Los valores de éstos para M1 tienden a decrecer pasando de un 99% a un 94% de eliminación. Para A1 los rendimientos crecen de un 88% a un 97%.

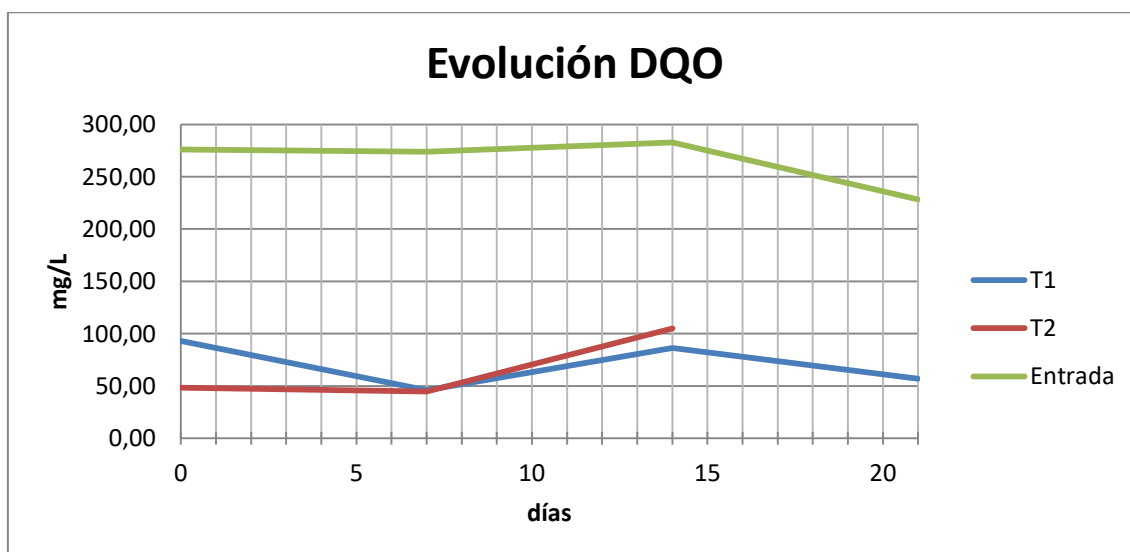


Figura 6. Evolución de la DQO de los reactores T1 y T2 y la entrada.

En la figura 6 se observa como la entrada tiene unos valores bastante estables, la mayoría de ellos por encima de 250 mg/L. La concentración en el reactor T2 parece estable al principio pero aumenta a la semana llegando a sobrepasar los 100 mg/L.

Una vez obtenidos los valores de DQO para cada reactor, se determina que los rendimientos para T2 son estables la primera semana manteniendo unos valores por encima del 80% de eliminación hasta que pasada una semana el valor cae hasta el 62%. Para T1 los valores crecen la primera semana pasando de un 66% a un 83%, luego este valor decae hasta un 69% y vuelve a crecer hasta un 75%.

Los reactores M1 y A1 disminuyen la DQO total de manera muy efectiva como se puede comprobar en las figuras 5 y 6 con rendimientos muy altos por encima del 90% la mayoría y con valores de concentración por debajo de los 80 mg/L excepto para un valor de M1 a los 23 días. La evolución pues en A1 es mucho más estable debido a la baja carga que se le añade, ya que su tiempo de retención hidráulico es el mismo que para M1 pero se diluye al 50%. Cabe decir que la escasez de valores de la DQO total de la entrada dificulta poder concluir con seguridad que estas tasas de eliminación se mantengan.

Teniendo en cuenta que dentro del reactor la única materia particulada es biomasa procedente del cultivo, se compara directamente la DQO soluble analizada en el reactor con la DQO total de la legislación para determinar si el tratamiento es suficiente para cumplir los requisitos.

Para los reactores T1 y T2 los valores de DQO en la entrada son mucho más bajos, aun así los rendimientos de eliminación también son bajos en comparación a los reactores M1 y A1. Esto se debe a que como su tiempo de retención es menor, la carga diaria que se le añade es mucho mayor. Como el TRH en T2 es menor a T1, lo normal sería pensar que la tendencia de la evolución de la concentración en T2 fuera en aumento.

Según estos requisitos para los vertidos procedentes de instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas sujetos a lo dispuesto en los artículos 4 y 5 de la Directiva 91/271/CE de 21 de Mayo, en donde se aplica el valor de concentración de DQO total (125mg/L) o el porcentaje de reducción (75%), podemos concluir también que los reactores M1, A1 cumplen holgadamente con éstos tanto de concentración como de rendimiento. Cabe indicar que existe un valor de concentración para M1 en donde ésta supera los 140 mg/L, pero es rápidamente disminuida. Igualmente, para estos dos sistemas harían falta más datos de entrada para observar con más detalle la evolución de la DQO total y su eliminación.

Para los reactores T1 y T2 se dan también los requisitos de concentración, ya que todos los valores se han dado por debajo de los 100 mg/L. Los rendimientos de T1 oscilan por el límite requerido, y los de T2 empiezan por encima pero decrecen a la

semana. Por lo tanto se necesitarían más datos para concluir que el TRH en estos sistemas es demasiado bajo como para que se dé una correcta eliminación de DQO.

- Fósforo

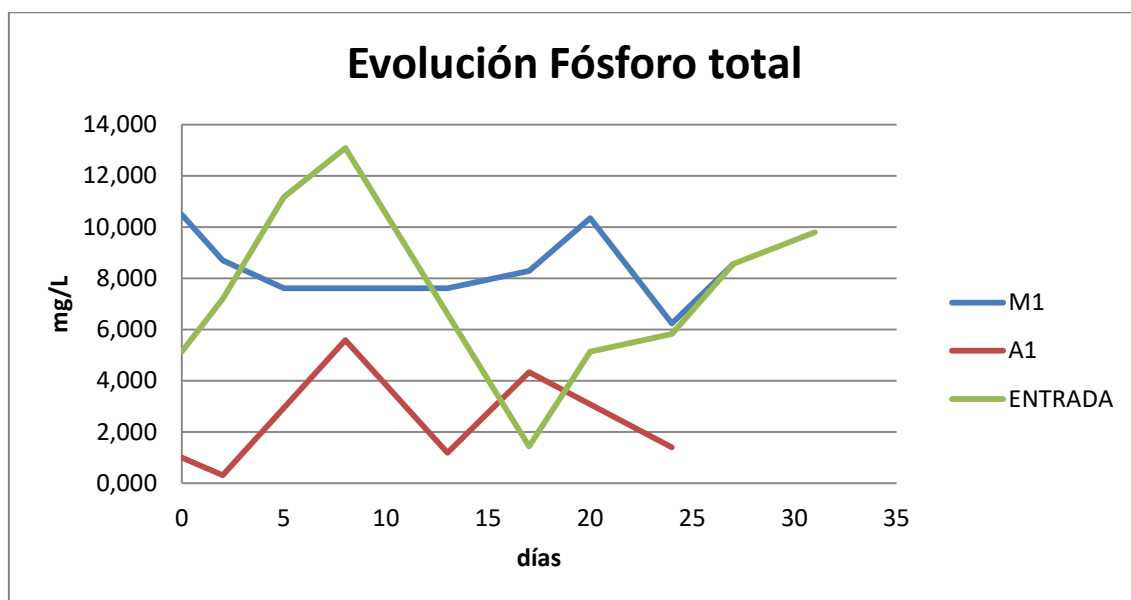


Figura 7. Evolución de la concentración de fósforo total de los reactores M1 y A1 y la entrada.

En la figura 7 se observa la evolución del fósforo en la entrada, se puede apreciar que no es una concentración constante a lo largo del experimento, con picos de casi 13 mg/L y caídas a casi 1 mg/L. Para el reactor M1 la concentración al inicio decrece de algo más de 10 mg/L a 7,5 mg/L, concentración que se mantiene estable hasta los 20 días, donde se observa un incremento de ésta de nuevo hasta los 10 mg/L y luego de repente hay una bajada a casi 6 mg/L y de nuevo sube hasta los 8,5 mg/L. Para A1 se observan subidas y bajadas de la concentración, aunque éstas son menores a M1 y oscilan entre los 0,3 mg/L hasta los 5,6 mg/L.

Para el cálculo de la eliminación se ha utilizado el valor de la analítica anterior de la entrada y el valor de la salida en el día correspondiente. Este procedimiento se ha llevado a cabo de esta manera para obtener resultados de eliminación de un día para otro, y ver la evolución de las tasas en todo el período de experimentación.

Una vez obtenidos los valores de fósforo total para cada reactor, se determina que las tendencias de uno y otro reactor son muy distintas. En M1 se observa como inicialmente el rendimiento es nulo, pero crece a medida que pasan los días llegando a un 67% de eliminación. Éste valor decrece rápidamente a los 10 días y pasa a ser nulo de nuevo, para volver a crecer hasta un 65%.

Valores de entrada variables, picos de concentración, acumulaciones debido a picos

Los rendimientos de eliminación de fósforo total de M1 oscilan entre un 0% y un casi 70%, con valores de salida de 6-10 mg/L. Para A1 los rendimientos son del 50-90% con valores de salida de entre 0,3 a 5,3 mg/L.

En T1 los valores oscilan entre los 0 mg/L y los 6 mg/L y tienen una tendencia a aumentar, teniendo un pico de concentración final de 8 mg/L, sus rendimientos de eliminación decrecen de un 80%, pasando por un 90%, a un 0%. En T2 los valores de salida también tienden a crecer, y oscilan entre los 0-4 mg/L con unos rendimientos que también tienden a disminuir en el tiempo de 100% al 48%.

Los valores de fósforo tanto orgánico como inorgánico se mantienen estables para M1 y A1. En cambio para T1 y T2, el fósforo inorgánico aumenta con el paso de los días mientras que el orgánico se mantiene estable con una ligera tendencia a aumentar.

Según los requisitos para los vertidos procedentes de instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas sujetos a lo dispuesto en los artículos 4 y 5 de la Directiva 91/271/CE de 21 de Mayo, en donde se aplica el valor de concentración de fósforo total de 1 mg/L para más de 100.000 habitantes equivalentes y 2 mg/L para 10.000-100.000 habitantes equivalentes y con rendimientos mínimos de eliminación del 80%, se determina que el reactor A1 cumple la normativa, en cambio, los reactores M1, T1 y T2 no, por su bajo y decreciente rendimiento, siempre por debajo del límite establecido aunque su concentración de salida sea inferior a la legislada.

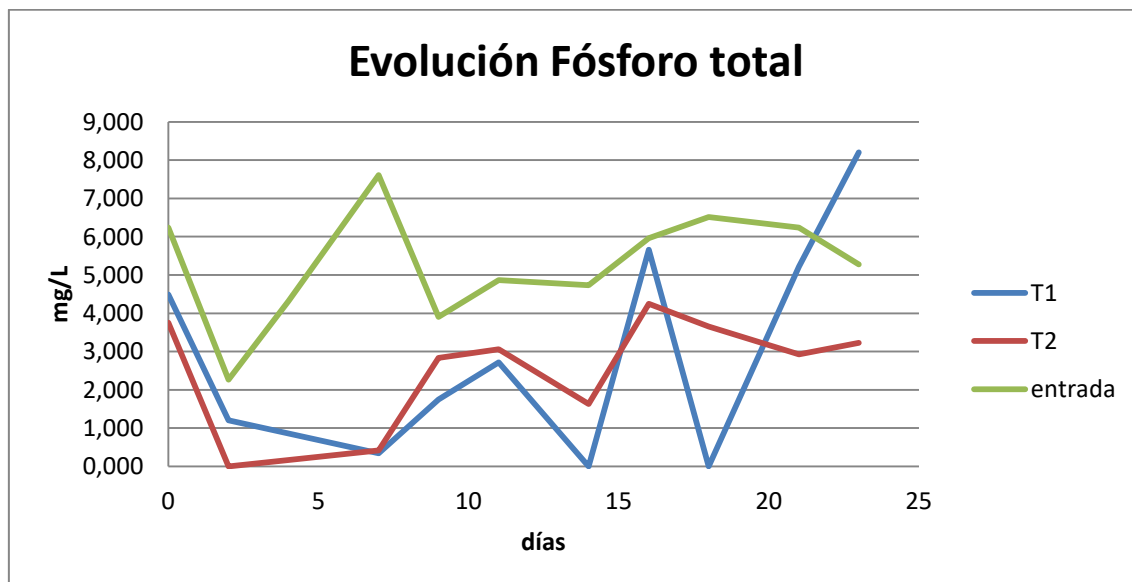


Figura 8. Evolución de la concentración de fósforo total de los reactores T1 y T2 y la entrada.

En la figura 8 se observa una tendencia similar en los dos reactores, siguiendo las cargas de concentración que aporta la entrada de agua residual, aumentando la concentración de los reactores a medida que éstos son alimentados. Se observan picos puntuales de concentración, pero sin alcanzar valores próximos a la entrada. Hay un último valor de T1 que sobrepasa los valores de la entrada, con una concentración de 8,2 mg/L.

Una vez obtenidos los valores de DQO para cada reactor , se determina que los valores de las tasas de eliminación van decreciendo para los dos reactores a medida que se alimentan. Pasando de una alta tasa de eliminación del 100% para T2 y de más del 80% para T1.

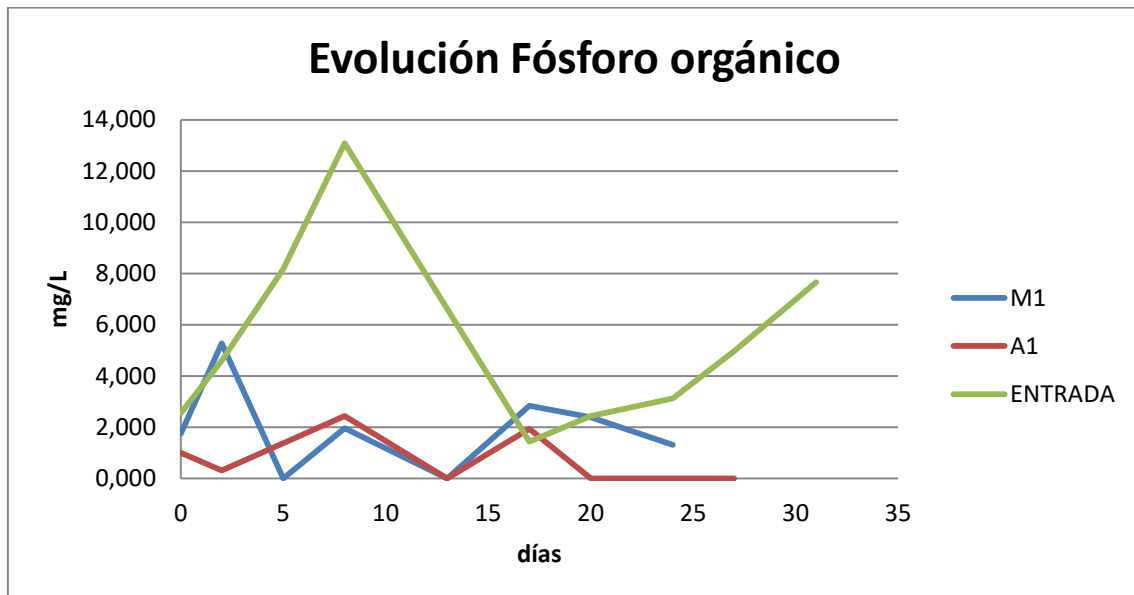


Figura 9. Evolución de la concentración de fósforo orgánico de los reactores M1 y A1 y la entrada.

Tal y como se observa en la figura 9 la concentración de la entrada va en aumento hasta llegar a los casi 13 mg/L a los 8 días, aunque existe este pico, la concentración en los reactores no aumenta excesivamente, y solo se encuentran picos de algo más de 2 mg/L.

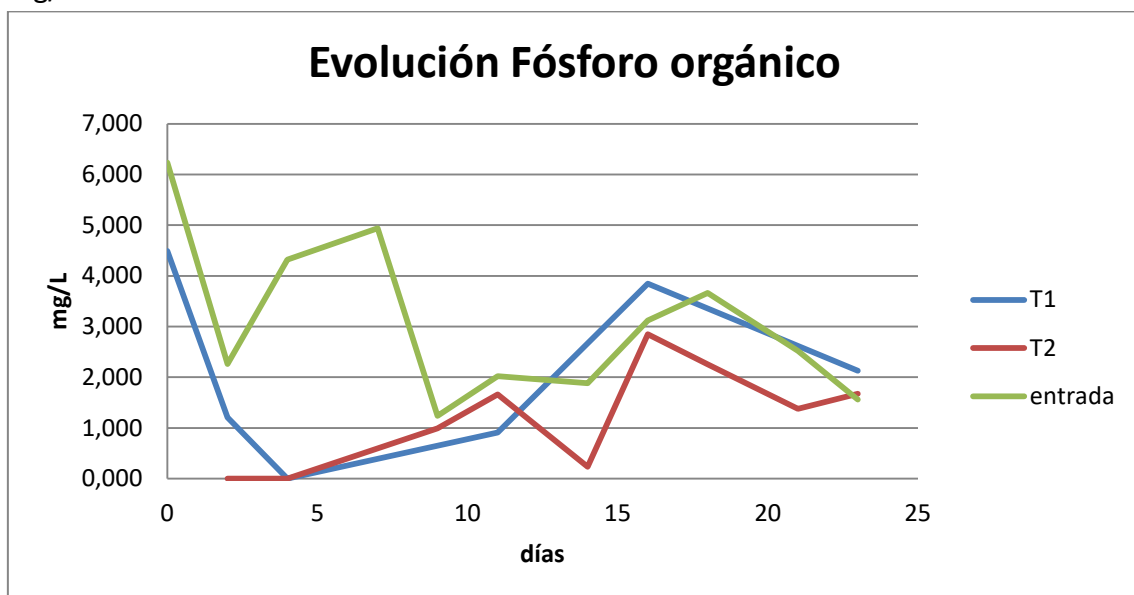


Figura 10. Evolución de la concentración de fósforo orgánico de los reactores T1 y T2 y la entrada.

En la figura 10 se observa una concentración inicial de 6 mg/L para la entrada, 4,5 mg/L para T1 y 0 para T2. Las concentraciones de entrada no son constantes, existiendo picos en todo el período de experimentación. La concentración en T2 decrece hasta llegar a un valor nulo, a partir de aquí se va incrementando hasta llegar a casi 4 mg/L, luego este valor decrece hasta los 2 mg/L. La concentración en T2 parece tener una tendencia creciente, con algunos picos y bajadas.

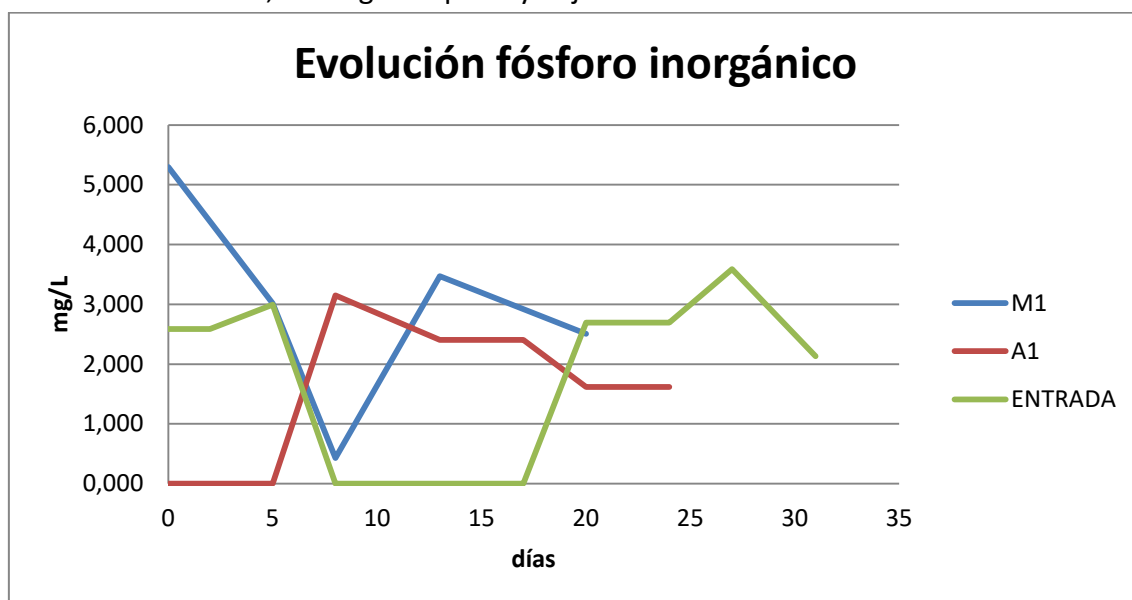


Figura 11. Evolución de la concentración de fósforo inorgánico de los reactores M1 y A1 y la entrada.

En la figura 11 se aprecia como los valores de la concentración del fósforo inorgánico no es nada constante en la entrada, con valores de hasta 3 mg/L hasta los 0 mg/L, esto afecta por ejemplo al reactor M1 que sufre una decrecimiento en la concentración, pasando de los casi 5 mg/L hasta los casi 0,5 mg/L, en cambio para A1 se observa un incremento de la concentración a partir del quinto día que llega hasta algo más de 3 mg/L y decrece paulatinamente a partir de ese momento.

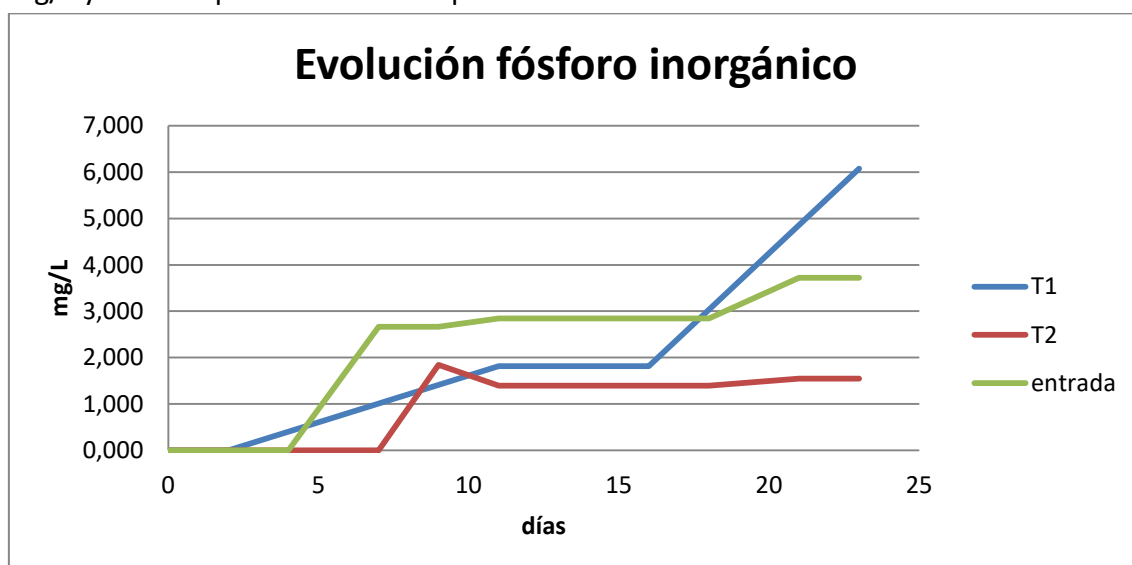


Figura 12. Evolución de la concentración de fósforo inorgánico de los reactores T1 y T2 y la entrada.

Se observa en la figura 12 unas concentraciones tanto para los reactores como para la entrada con tendencias crecientes en todo el período de experimentación.

- Nitrogeno

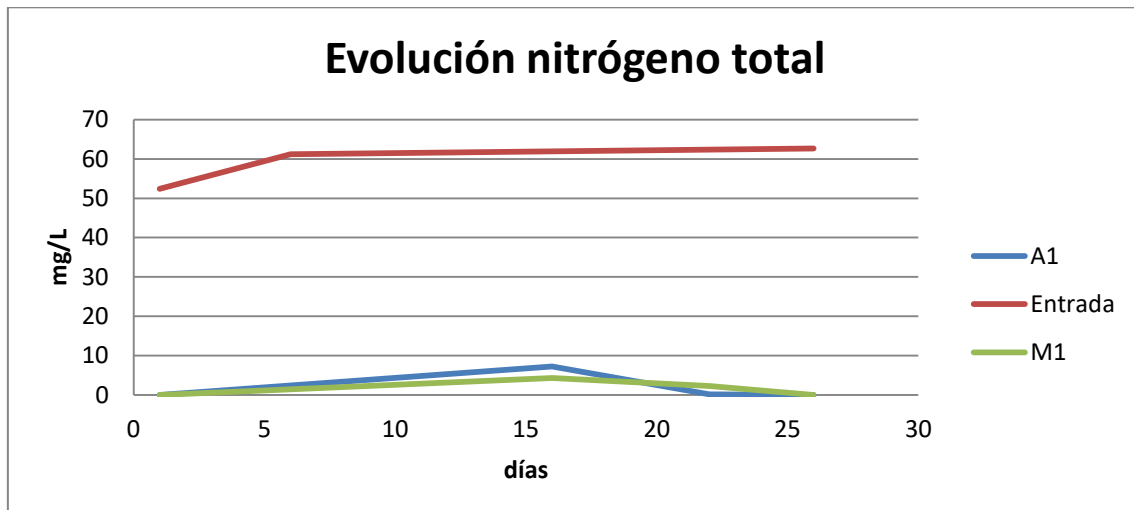


Figura 13. Evolución de la concentración de nitrógeno total de los reactores M1 y A1 y la entrada.

Tal y como se observa en la figura 13 las concentraciones tanto para la entrada como para los reactores son constantes. Se puede apreciar como los valores de concentración de los reactores son muy inferiores a la entrada, siendo en algunos casos nulos.

Para el cálculo de la eliminación se ha utilizado el valor de la analítica anterior de la entrada y el valor de la salida en el día correspondiente. Este procedimiento se ha llevado a cabo de esta manera para obtener resultados de eliminación de un día para otro, y ver la evolución de las tasas en todo el período de experimentación.

Una vez obtenidos los valores de DQO para cada reactor, se determina que la tasa de eliminación para los dos reactores es prácticamente del 100% en todo el período de experimentación.

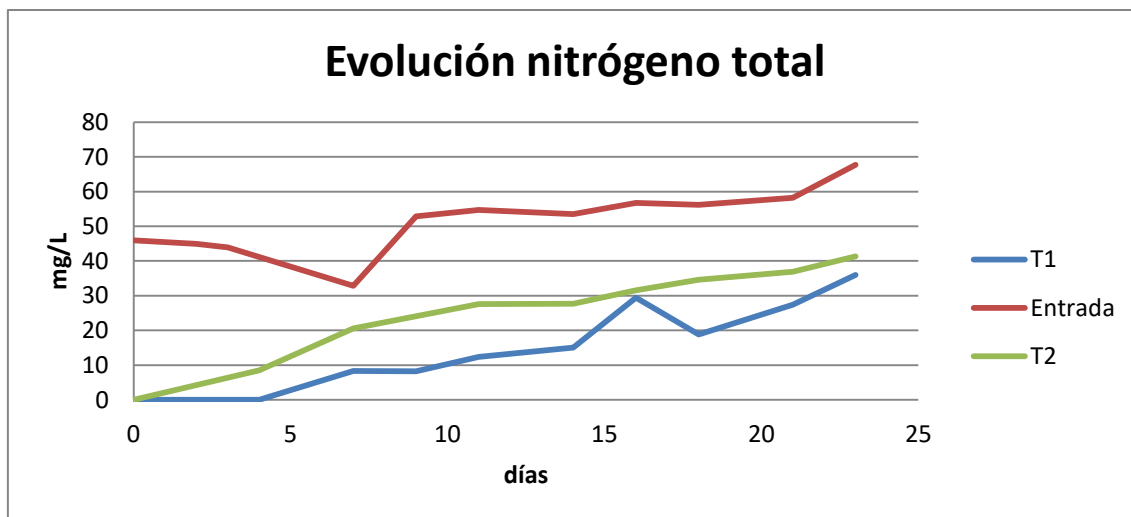


Figura 14. Evolución de la concentración de nitrógeno total de los reactores T1 y T2 y la entrada.

En la figura 14 se aprecia como las concentraciones en los reactores van aumentando paulatinamente des de los 0 mg/L hasta los 35 mg/L para T1 y los 41 mg/L para T2. Una vez obtenidos los valores de DQO para cada reactor, se determina que el rendimiento de eliminación de los reactores decrece con el paso de los días, llegando a un 32% para T1 y un 24% para T2.

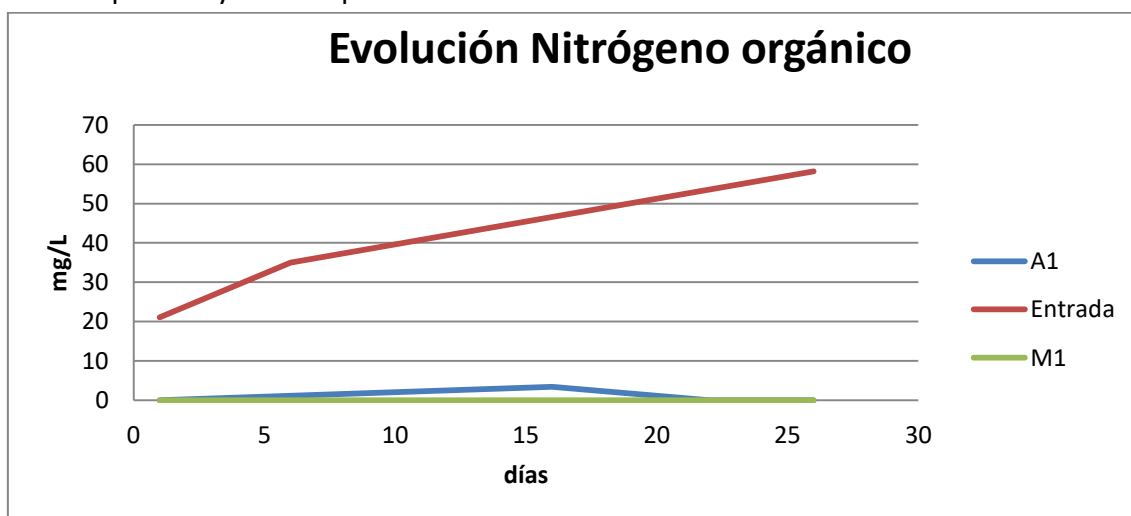


Figura 15. Evolución de la concentración de nitrógeno orgánico de los reactores M1 y A1 y la entrada.

En la figura 15 se observa como la concentrción de fósforo orgánico en la entrada aumenta con el paso de los días llegando a concentraciones de casi 60 mg/L. La concentración en los reactores aumenta ligeramente a las dos semanas pero vuelve a valores nulos al final de la experimentación.

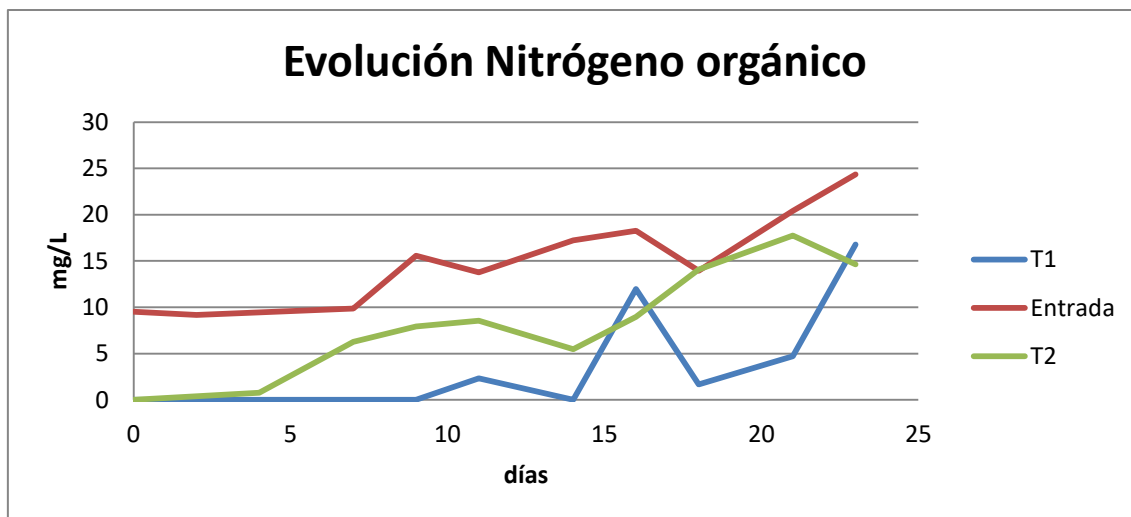


Figura 16. Evolución de la concentración de nitrógeno orgánico de los reactores T1 y T2 y la entrada.

En la figura 16 se observa un aumento en la concentración de la entrada, así como de los reactores, en todo el período de experimentación.

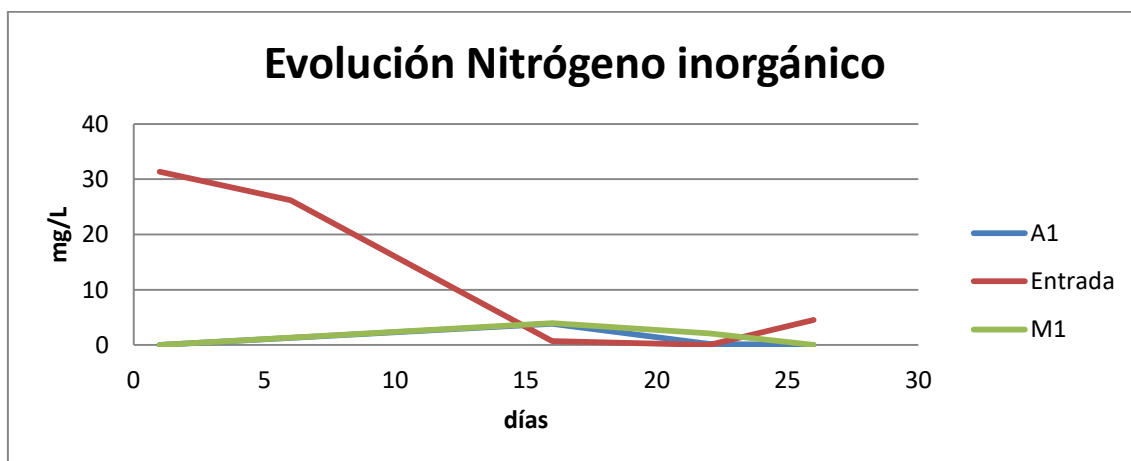


Figura 17. Evolución de la concentración de nitrógeno inorgánico de los reactores M1 y A1 y la entrada.

En la figura 17 se aprecia como las concentraciones de entrada van disminuyendo día a día, llegando a valores prácticamente nulos. La concentración en los reactores se mantiene por debajo de los 3,2 mg/L en todo el período, partiendo de una concentración inicial nula al principio seguido de un incremento como se ha comentado y un posterior decrecimiento hasta valores nuevamente nulos.

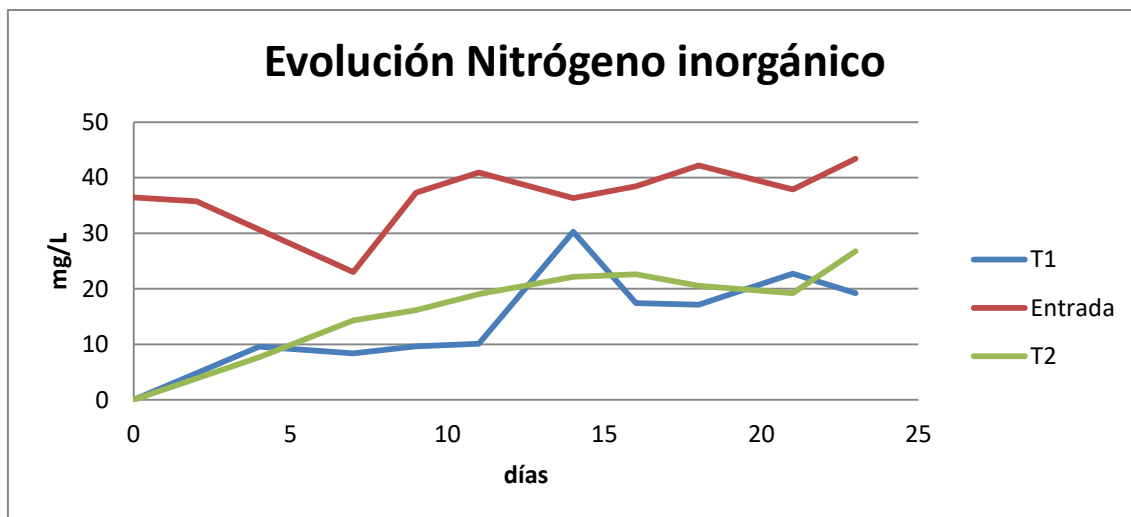


Figura 18. Evolución de la concentración de nitrógeno inorgánico de los reactores T1 y T2 y la entrada.

En la figura 18 se observan concentraciones constantes en la entrada, con algún decrecimiento a la semana, llegando a los 23 mg/L y un posterior crecimiento que se mantiene estable en todo el período. Las concentraciones en los dos reactores van en aumento a medida que pasan los días.

Los valores de entrada son bastante constantes en M1 y A1, y los de T1 y T2 van aumentando con el paso de los días. Las evoluciones en los valores de salida de los reactores se presentan sin muchas oscilaciones. En M1 y A1 los valores de salida son prácticamente nulos, mostrando unas tasas de eliminación del 100% en prácticamente todo el período de experimentación. En cambio las concentraciones en T1 y T2 van aumentando haciendo disminuir sus rendimientos de eliminación.

La misma tendencia siguen el nitrógeno orgánico e inorgánico, estables y muy bajos en M1 y A1 y con tendencias crecientes en T1 y T2.

Según los requisitos para los vertidos procedentes de instalaciones de tratamiento de aguas residuales urbanas sujetos a lo dispuesto en los artículos 4 y 5 de la Directiva 91/271/CE de 21 de Mayo, en donde se aplica el valor de concentración de nitrógeno total de 10 mg/L para más de 100.000 habitantes equivalentes y 15 mg/L para 10.000-100.000 habitantes equivalentes y con rendimientos mínimos de eliminación del 70-80%, se determina que los reactores M1 y A1 cumplen la normativa, y en cambio, los reactores T1 y T2 no, por su bajo y decreciente rendimiento, siempre por debajo del límite establecido

Asimilación de nutrientes

En este apartado se muestran los resultados del estudio de asimilación de los nutrientes, es otra manera de ver la capacidad de la biomasa a la hora de eliminar los nutrientes. Para ello se trabaja con los valores obtenidos tanto de la entrada como del reactor para analizar la carga diaria añadida, y el valor en el efluente que ayuda a determinar la capacidad de ésta biomasa a la hora de assimilar los nutrientes y removerlos del medio.

Entrada	Reactor
DQO Total	DQO soluble
TOC	TOC soluble
IC	IC
N orgánico	N orgánico
P orgánico	P orgánico

Para estudiar la concentración en el efluente de los diferentes parámetros se utilizan los valores de las concentraciones de los reactores. Cuanta menos concentración de cada elemento haya en la salida, más cantidad de este elemento ha sido assimilada por la biomasa.

DQO

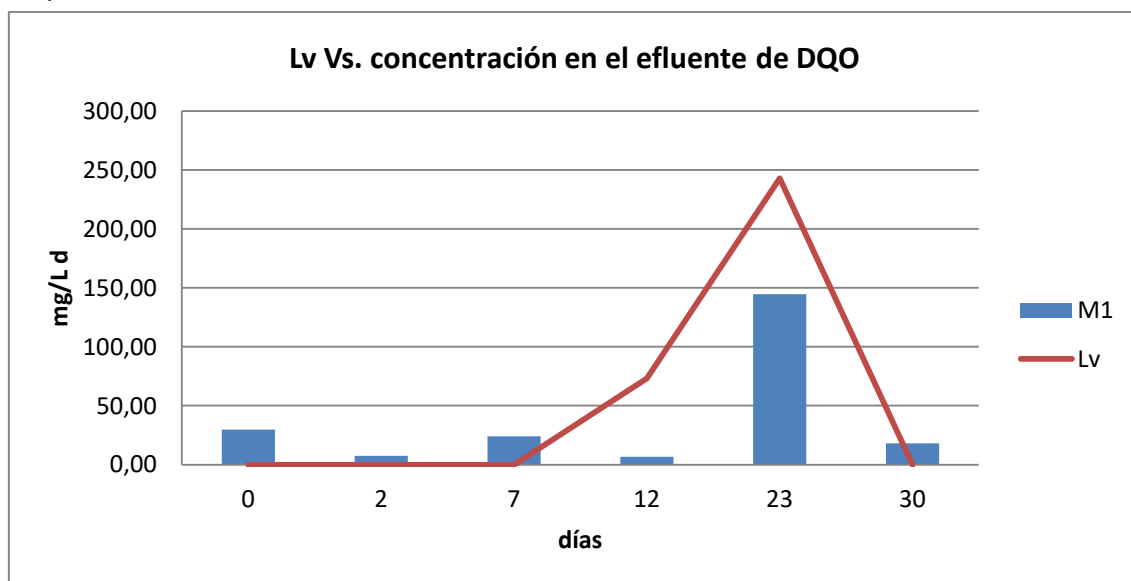


Figura 19. Evolución de la acumulación de DQO en el reactor M1 y la aportación de carga de la entrada

En la figura 19 se observa como la carga de entrada es prácticamente nula los primeros 7 días, a partir de la semana aumenta hasta valores de casi 250 mg/L y vuelve a descender hasta llegar de nuevo a un valor nulo. En el reactor se observa como la concentración va oscilando sin pasar de los 30 mg/L hasta llegar a la 3 semanas, donde la concentración aumenta hasta llegar a un pico de 144 mg/L, luego vuelve a disminuir hasta los 17 mg/L.

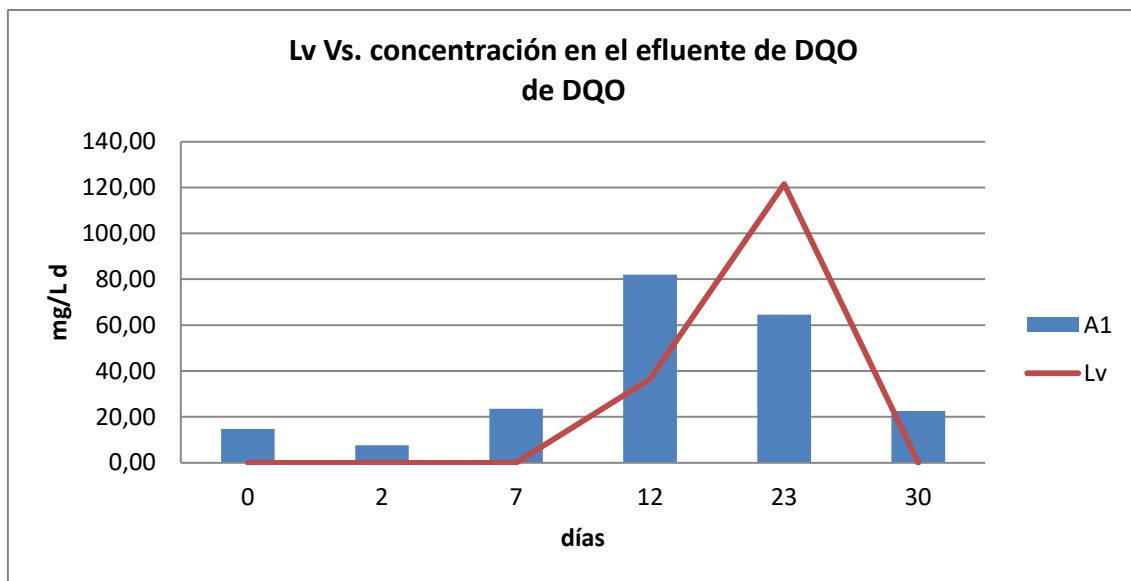


Figura 20. Evolución de la acumulación de DQO en el reactor A1 y la aportación de carga de la entrada

En la figura 20 se aprecia como la concentración de la entrada es la mitad que en M1 consecuencia de la dilución. La concentración en el reactor desciende los primeros días y luego aumenta a la semana de 23,5 mg/L a 82 mg/L, después disminuye paulatinamente hasta los 22 mg/L.

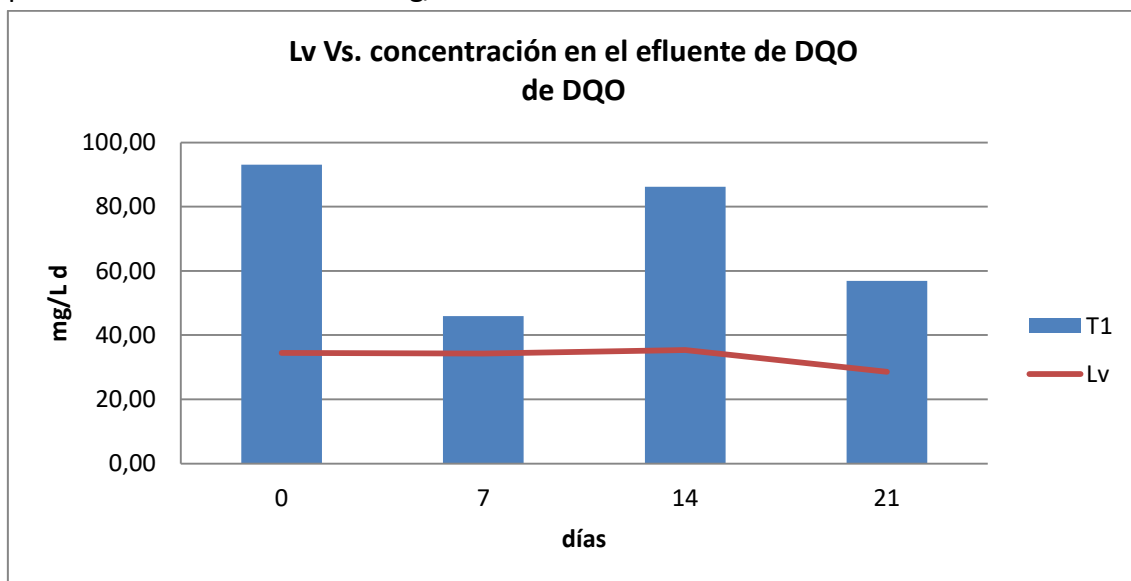


Figura 21. Evolución de la acumulación de DQO en el reactor T1 y la aportación de carga de la entrada

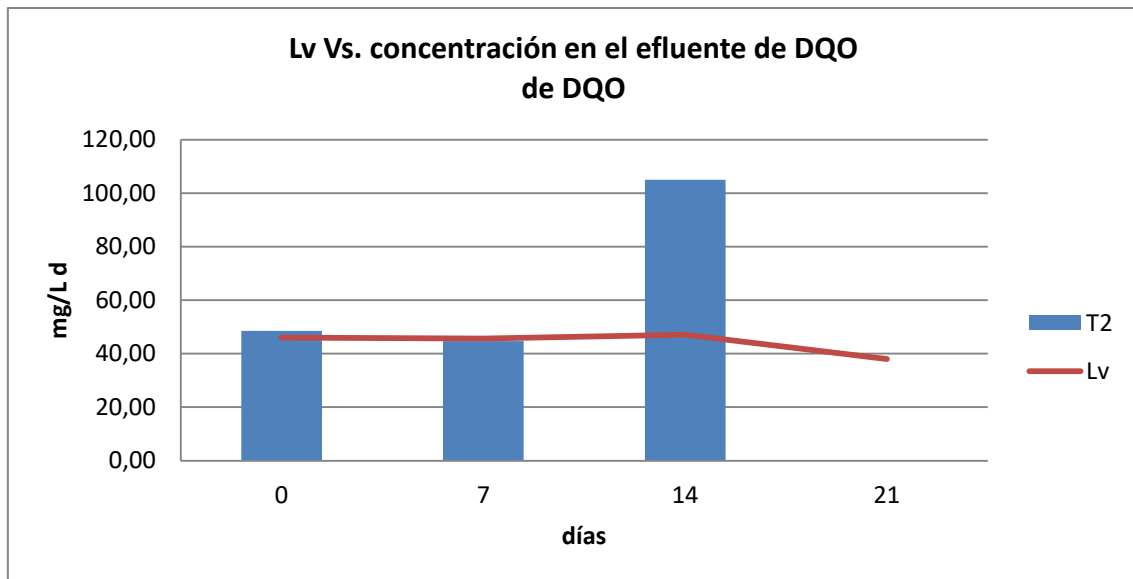


Figura 22. Evolución de la acumulación de DQO en el reactor T2 y la aportación de carga de la entrada

Tanto en la figura 21 como en la 22 se observa una entrada con una concentración constante oscilando los 40-50 mg/L. Para el reactor T1 la concentración es más alta que en la entrada, oscilando con valores de 45-90 mg/L. En T2 la concentración inicial es menor, pero aumenta hasta los 105 mg/L a las dos semanas.

Se puede apreciar como los reactores M1 y A1 asimilan el pico de carga que les llega a las tres semanas de manera notable, eso demuestra que el cultivo es capaz de asimilar tal carga y eliminar altas cargas de DQO como en el caso de M1 que pasa de casi 250 mg/L a los 18 mg/L en una semana.

Para T1 y T2 no se sigue la misma dinámica. La concentración de entrada es más baja aunque constante des del inicio, y aunque parece que T1 asimila la carga de DQO, después aumentan los valores, y de nuevo disminuyen.

TOC

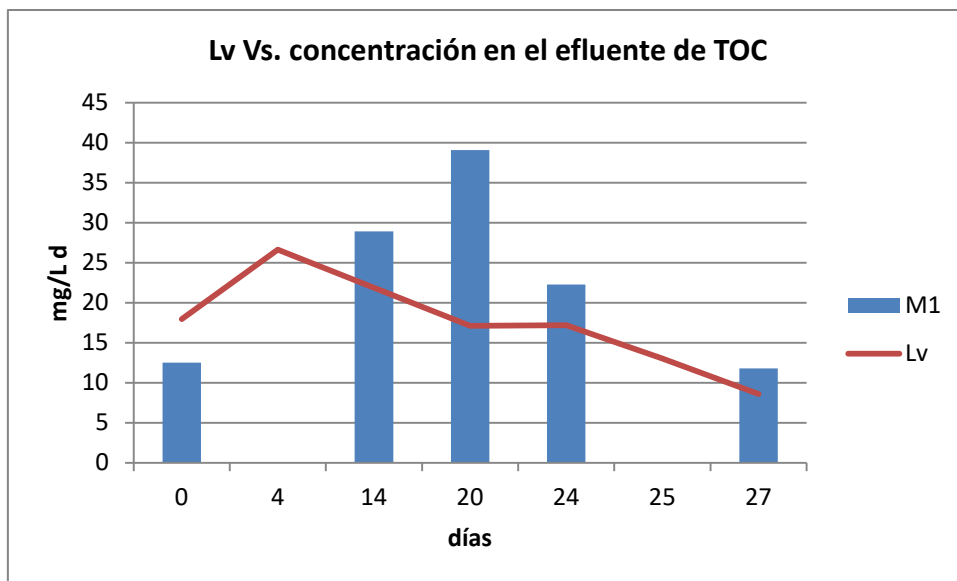


Figura 23. Evolución de la acumulación de TOC en el reactor M1 y la aportación de carga de la entrada

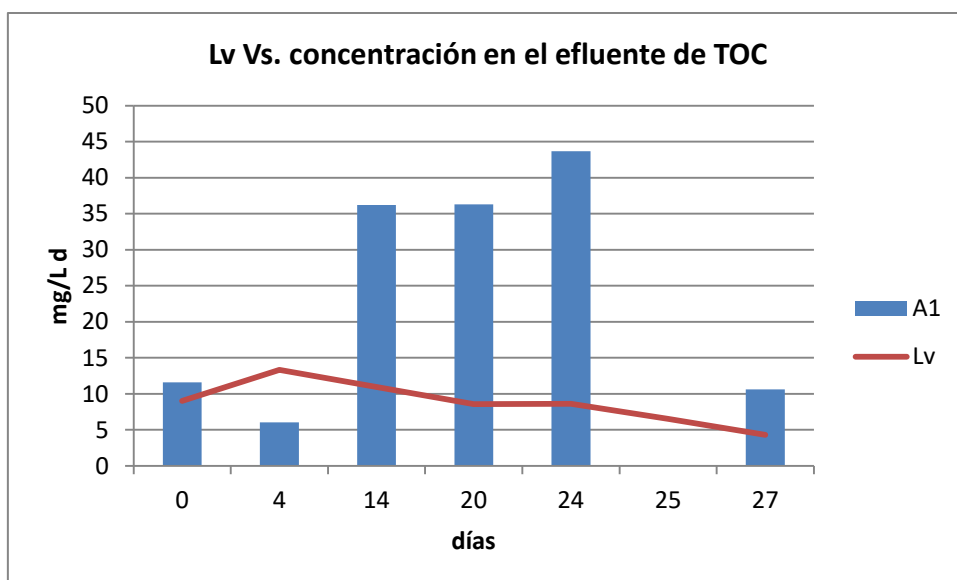


Figura 24. Evolución de la acumulación de TOC en el reactor A1 y la aportación de carga de la entrada

En la figura 23 y 24 la tendencia es prácticamente la misma. La carga de entrada aumenta ligeramente (el doble en M1 por efecto de la dilución de A1) y la concentración dentro del reactor aumenta a las dos semanas manteniéndose alta durante 10 días, para después decrecer de manera notable.

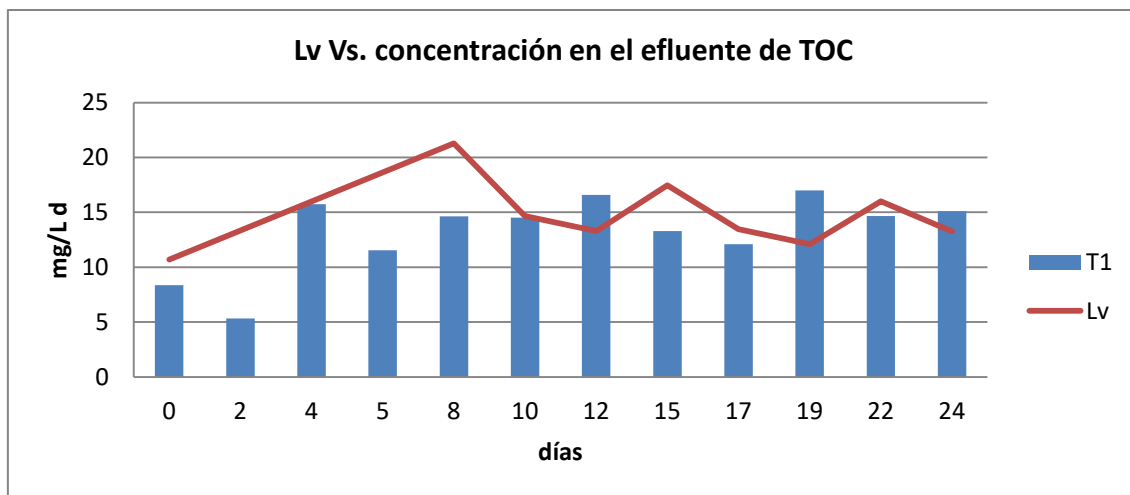


Figura 25. Evolución de la acumulación de TOC en el reactor T1 y la aportación de carga de la entrada

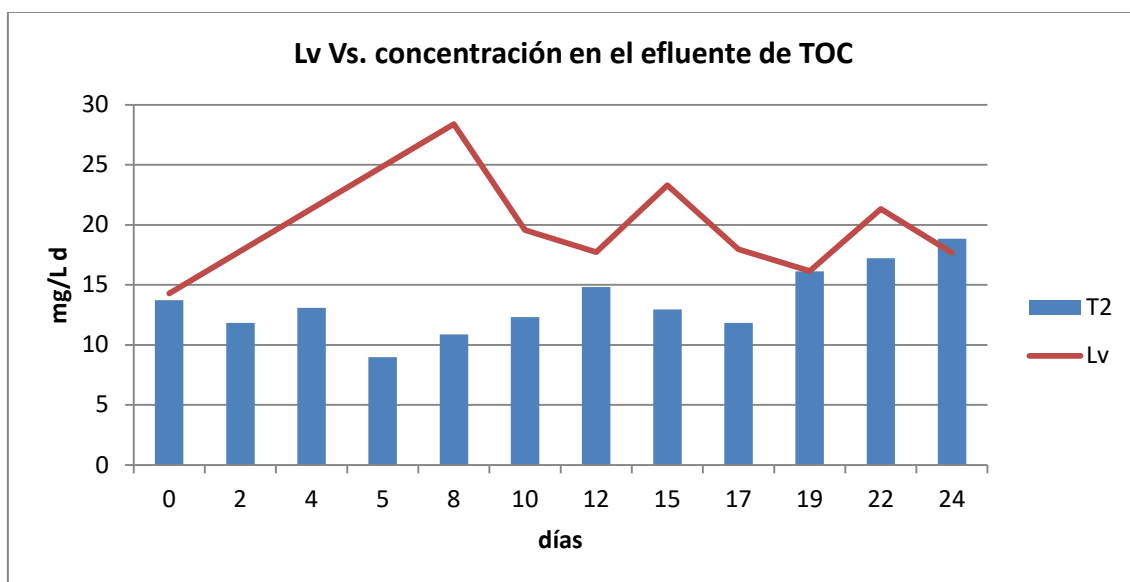


Figura 26. Evolución de la acumulación de TOC en el reactor T2 y la aportación de carga de la entrada

La tendencia observada en las figuras 25 y 26 es también la misma. La entrada va aumentando su carga durante la primera semana y luego va decreciendo aun con algún pico. La concentración en los reactores aumenta al inicio y se va manteniendo alta durante toda la experimentación, en T1 oscilando en los 15 mg/L y en T2 llegando hasta los 20 mg/L finales.

La tendencia en los reactores M1 y A1 es la de asimilar la carga de carbono orgánico total. A la mitad del experimento parece que no lo consiguen asimilar, pero al final del período se obtienen valores mínimos, 11 mg/L en M1 y 10 mg/L en A1, en comparación con el resto del proceso.

En T1 y T2 la se observa como el TOC aumenta de concentración al inicio del experimento y luego se mantiene constante, siendo éstos reactores incapaces de disminuir su concentración asimilándolo.

IC

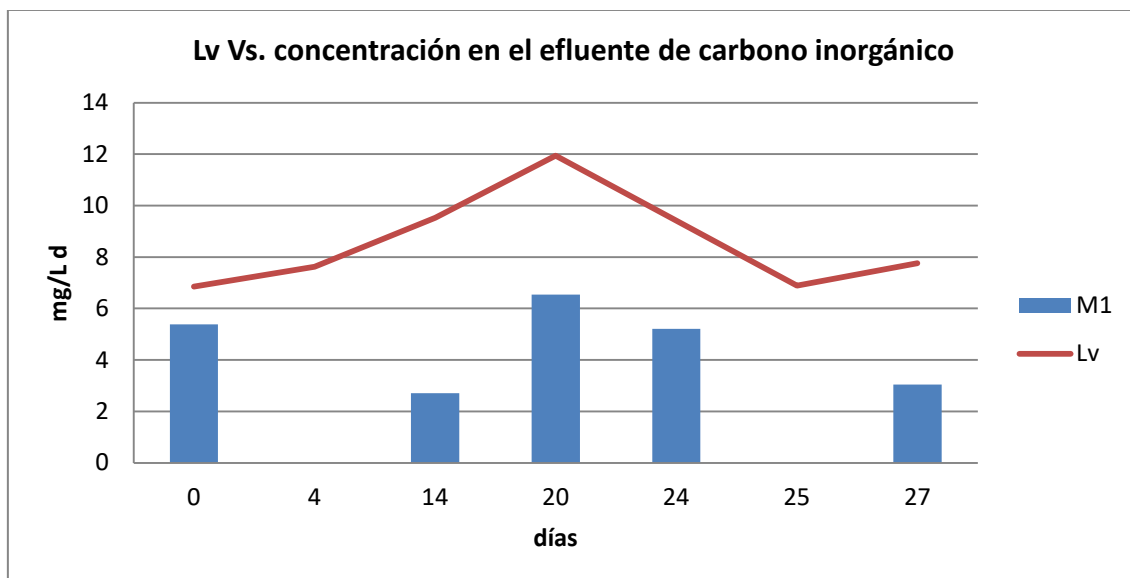


Figura 27. Evolución de la acumulación de IC en el reactor M1 y la aportación de carga de la entrada

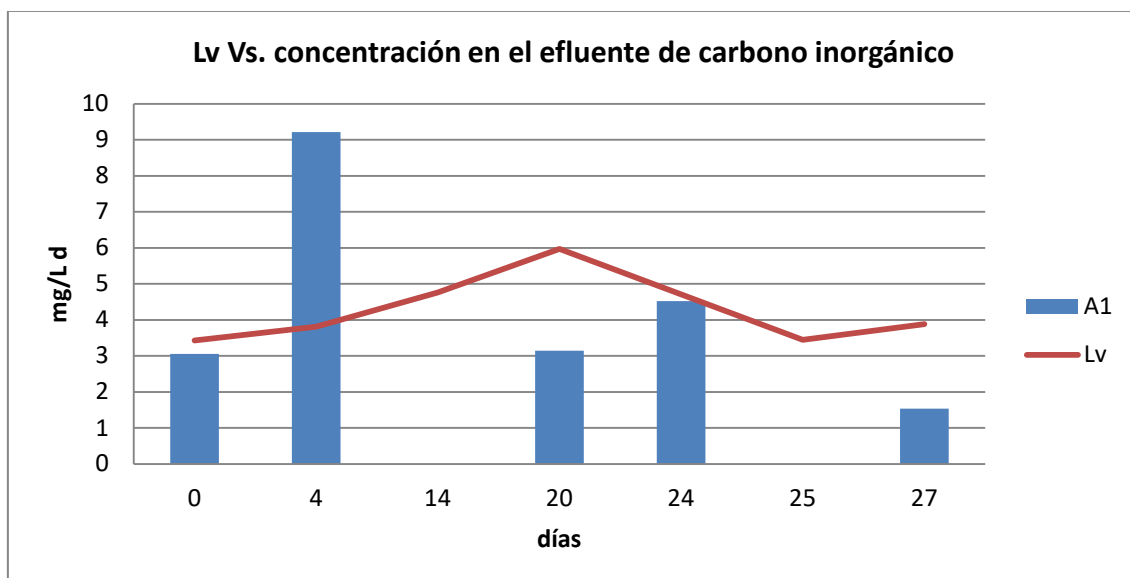


Figura 28. Evolución de la acumulación de IC en el reactor A1 y la aportación de carga de la entrada

Tal y como se observa en las figuras 27 y 28 la carga de entrada en A1 aumenta desde los 3,5 mg/L del inicio hasta los 6 mg/L para después disminuir hasta los 3,5 mg/L, en M1 la tendencia es la misma solo que con el doble de valor en la carga. La concentración en el reactor M1 se mantiene constante en todo el período sin pasar de los 6,5 mg/L y disminuyendo al final llegando a los 3 mg/L. En A1 al inicio aumenta la concentración hasta los 9 mg/L para luego tender a descender hasta los 1,5 mg/L finales.

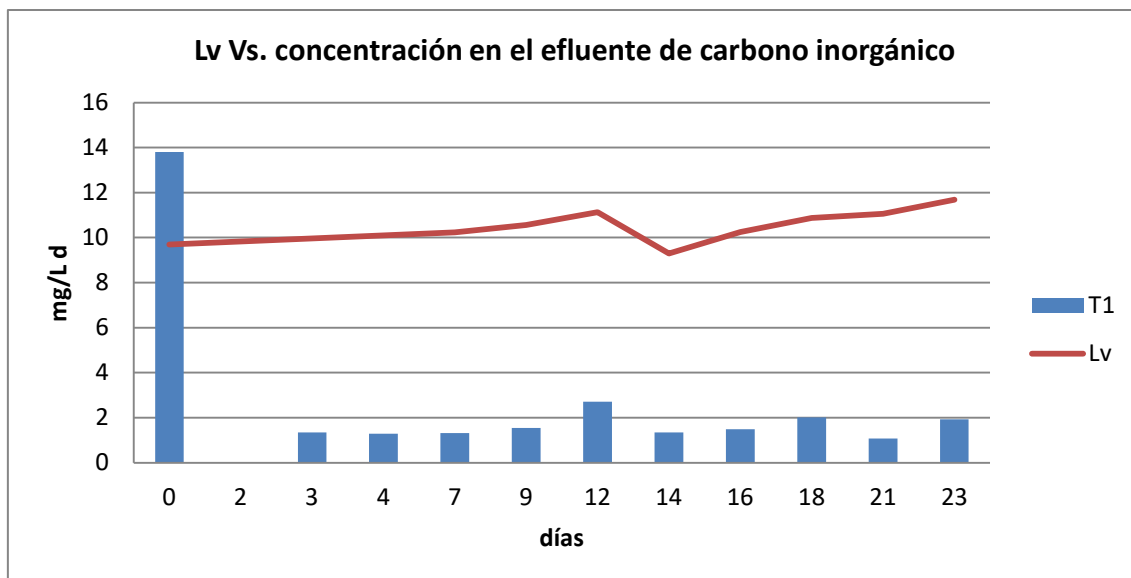


Figura 29. Evolución de la acumulación de IC en el reactor T1 y la aportación de carga de la entrada

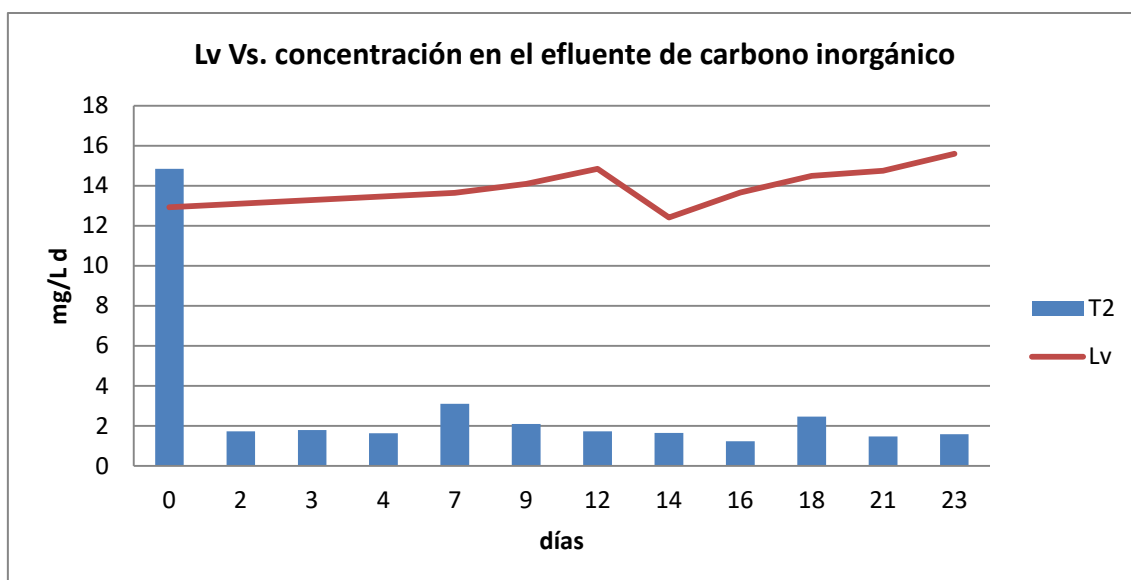


Figura 30. Evolución de la acumulación de IC en el reactor T2 y la aportación de carga de la entrada

En las figuras 29 y 30 se observa prácticamente la misma tendencia. La carga de entrada se mantiene constante oscilando entre los 12-15 mg/L, en los reactores se empieza con una alta concentración de carbono inorgánico (14 mg/L) y de repente el valor disminuye por debajo de los 4 mg/L manteniéndose así en todo el período de experimentación.

En comparación, los reactores T1 y T2 son capaces de asimilar mucho mejor el carbono inorgánico como se aprecia en las figuras 29 y 30 que los reactores A1 y M1, partiendo de una concentración inicial de 14 mg/L y rápidamente disminuirla por debajo de 4 mg/L.

Fósforo total

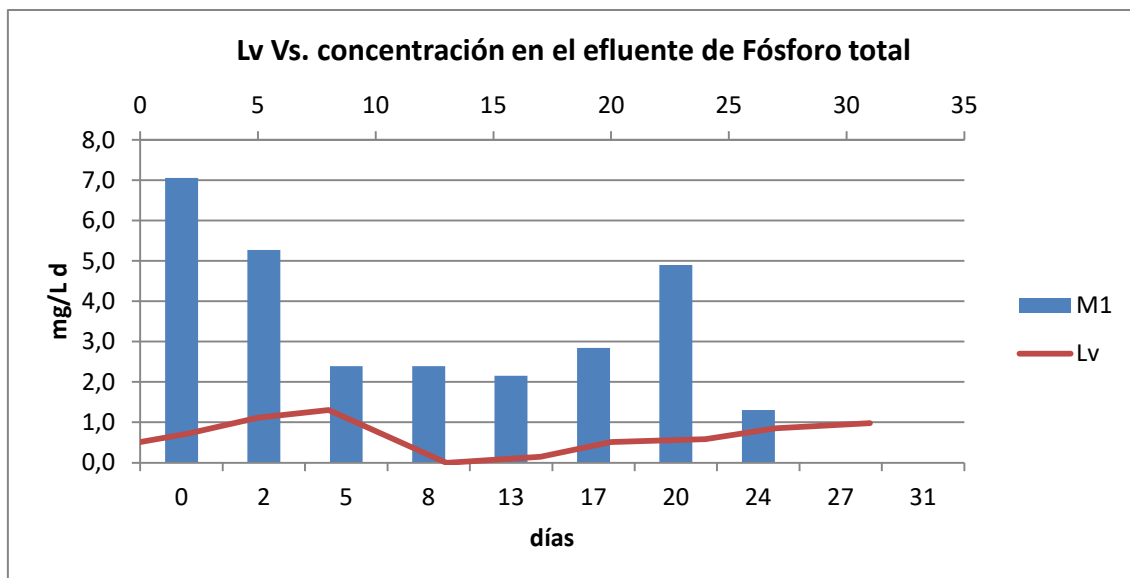


Figura 31. Evolución de la acumulación de fósforo total en el reactor M1 y la aportación de carga de la entrada

En la figura 31 se observa una carga inicial de entrada baja (0,5 mg/L) en comparación a la que se encuentra en el reactor (7 mg/L). Ésta carga aumenta inicialmente, llegando a estar escasamente por encima de 1 mg/L, después baja hasta un valor nulo para crecer hasta el final del período llegando de nuevo a 1 mg/L. La concentración del reactor decrece inicialmente y se estabiliza entre los días 5 y 13, después aumenta llegando a los casi 5 mg/L en el día 20 para luego bajar hasta algo más de 1 mg/L.

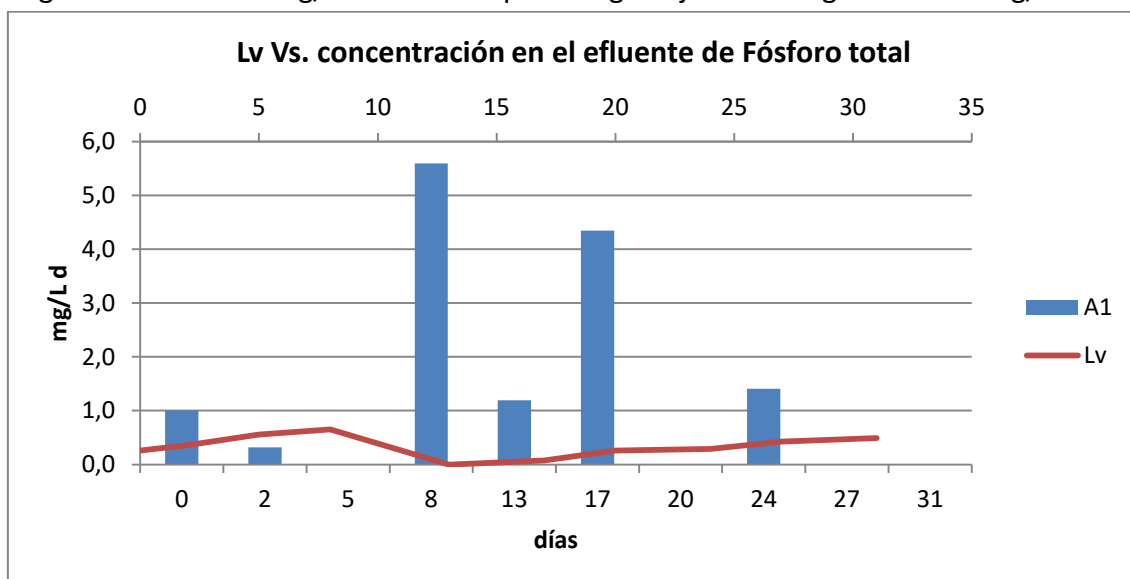


Figura 32. Evolución de la acumulación de fósforo total en el reactor A1 y la aportación de carga de la entrada

La tendencia de la carga de entrada que se encuentra en la figura 32 es la misma que en la figura 31 pero con valores algo más bajos. La tendencia del reactor es totalmente diferente. La concentración de inicial de salida es de 1 mg/L y decrece a los dos días hasta un valor de 0,3 mg/L. Seis días después la concentración presenta una subida notable hasta los 5,6 mg/L para decrecer significativamente hasta los 1,2 mg/L, volver a subir hasta los 4,3 mg/L y volver a decrecer hasta los 1,4 mg/L.

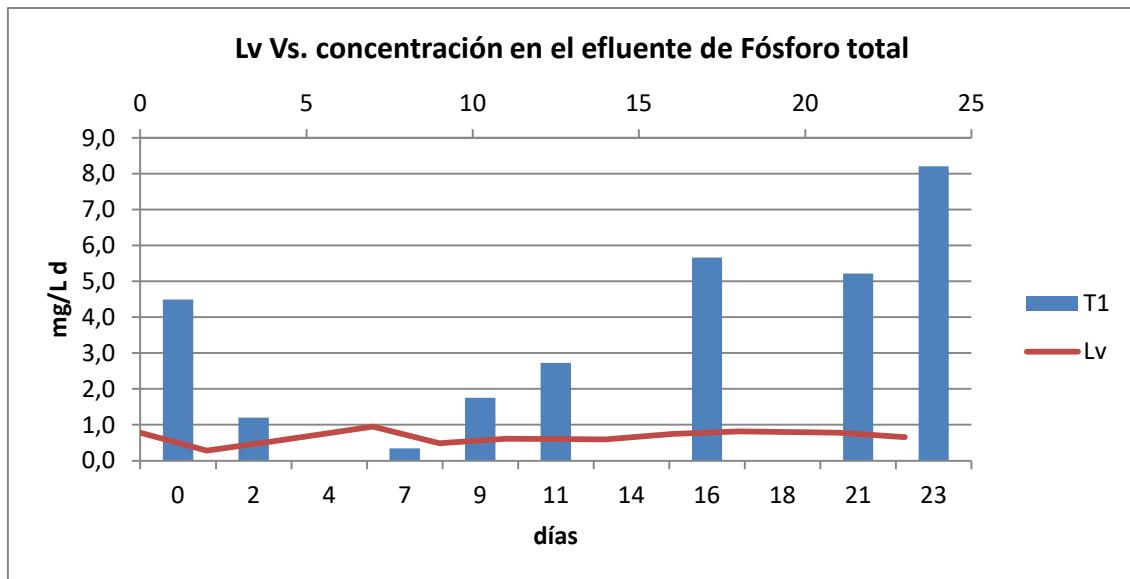


Figura 33. Evolución de la acumulación de fósforo total en el reactor T1 y la aportación de carga de la entrada

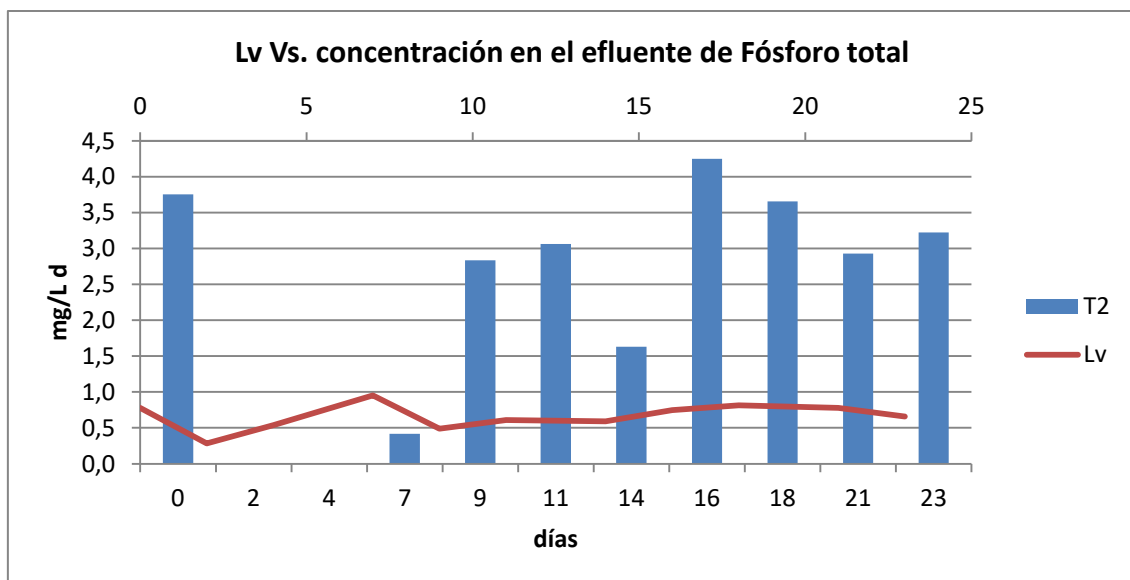


Figura 34. Evolución de la acumulación de fósforo total en el reactor T2 y la aportación de carga de la entrada

La tendencia de la carga de entrada en las figuras 33 y 34 es prácticamente la misma que en las figuras 39 y 40. La concentración de salida en T1 parece tender a la acumulación, aumentando paulatinamente la concentración de salida del reactor. En el caso de T1, la concentración no disminuye desde el inicio y se mantiene estable pero sin decrecer.

La carga de entrada de fósforo total es similar a todos los reactores, no obstante la tendencia de cada uno de ellos no lo es. Los reactores A1 y M1 tienden a eliminar contenido de fósforo total en la salida, M1 desde el comienzo, y A1 desde que tiene picos de concentración a mediados de la experimentación. Para T1 y T2 se observa como la concentración aumenta y no disminuye, se estabiliza para el caso de T2 con valores oscilantes entre 3-4 mg/L y tiende a crecer como en T1, llegando a sobrepasar los 8 mg/L.

Nitrógeno total

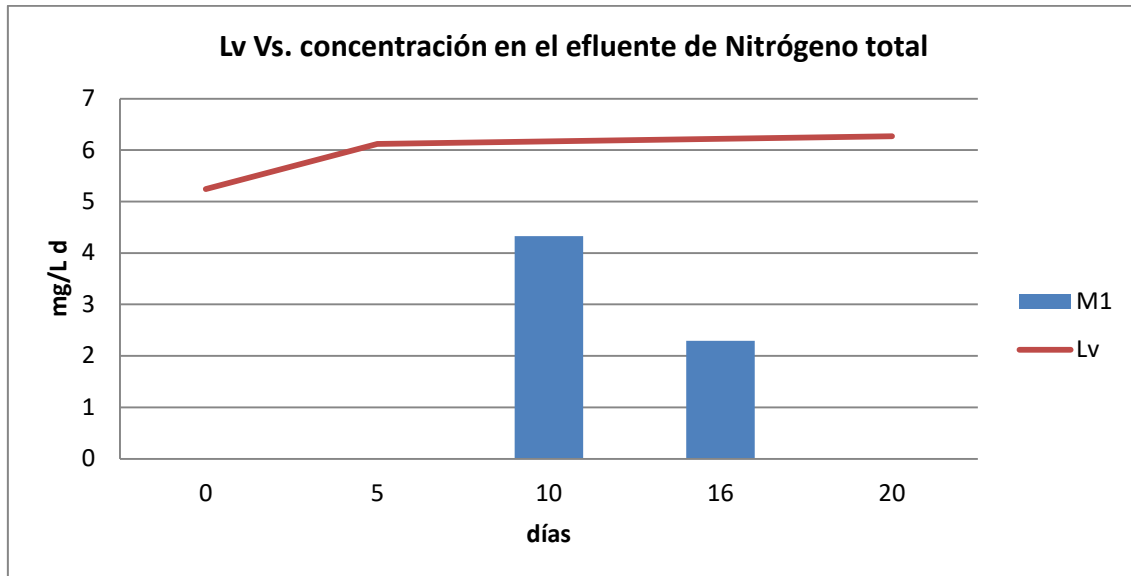


Figura 35. Evolución de la acumulación de nitrógeno total en el reactor M1 y la aportación de carga de la entrada

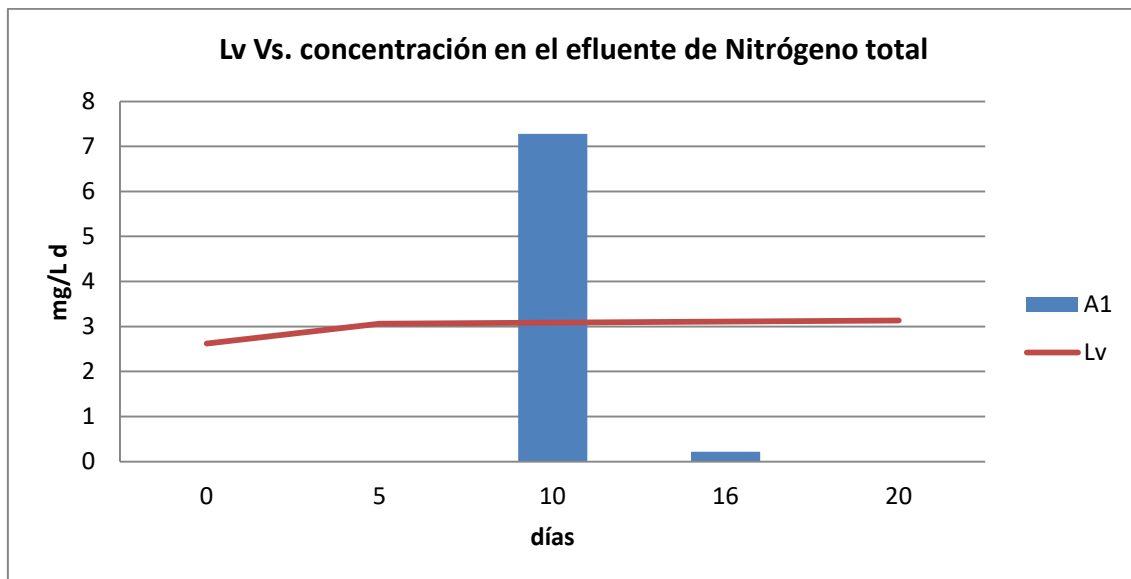


Figura 36. Evolución de la acumulación de nitrógeno total en el reactor A1 y la aportación de carga de la entrada

En las figuras 35 y 36 la carga de entrada se mantiene constante, con algo más de 6 mg/L para M1 y 3 para A1. La concentración en la salida desciende en ambos reactores, pasando de 4,3 mg/L a 2,3 mg/L en M1 y de 7,3 mg/L a 0,2 mg/L en A1.

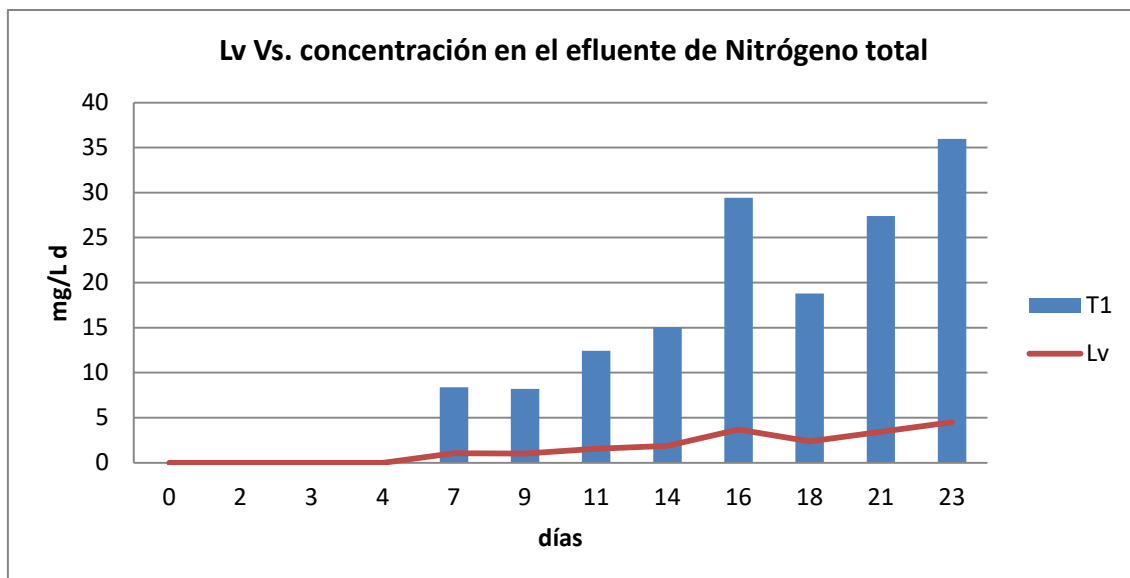


Figura 37. Evolución de la acumulación de IC en el reactor T1 y la aportación de carga de la entrada

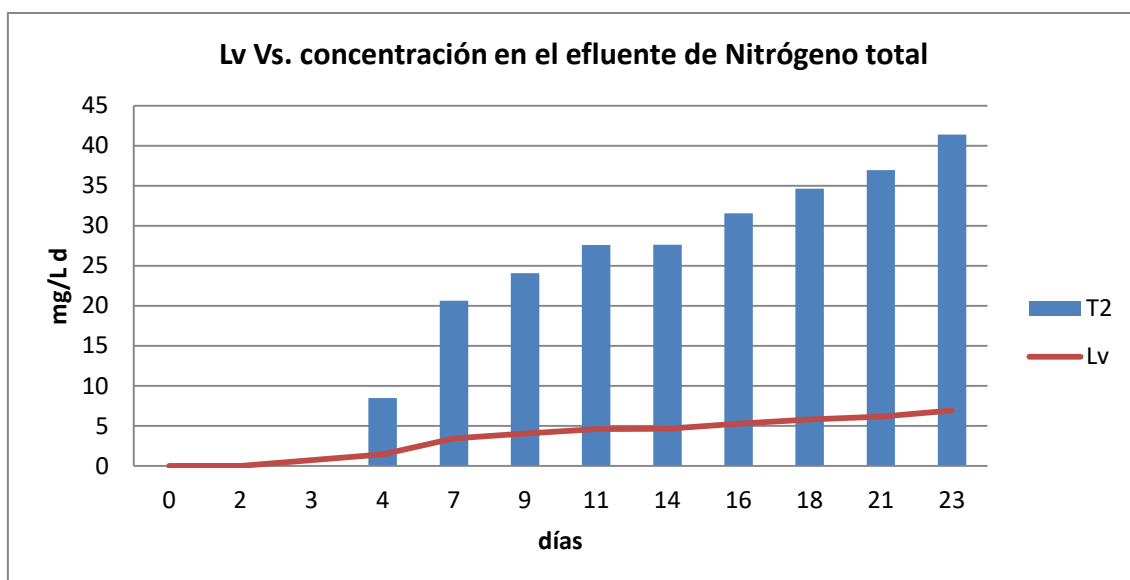


Figura 38. Evolución de la acumulación de IC en el reactor T2 y la aportación de carga de la entrada

La carga de entrada en T1 y T2 dibujada en las figuras 37 y 38 tiende a aumentar desde un inicio, llegando a valores de 6,9 mg/L en T2 y de 4,5 mg/L en T1. La concentración en la salida para ambos tiende a aumentar por encima de 35 mg/L para T1 y de 40 mg/L para T2.

En los reactores M1 y A1 se observa una tendencia a la eliminación de nitrógeno en la salida, algo totalmente opuesto a lo que sucede en T1 y T2, donde la concentración de nitrógeno, que partía de ser nula, aumenta día tras día.

Producción biomassa

En este apartado se muestran los resultados de la producción de biomasa. Para ello se dibujan las siguientes gráficas:

SST

La gráfica de la evolución de SST indica la concentración que hay de algas, bacterias y otros sólidos en el reactor

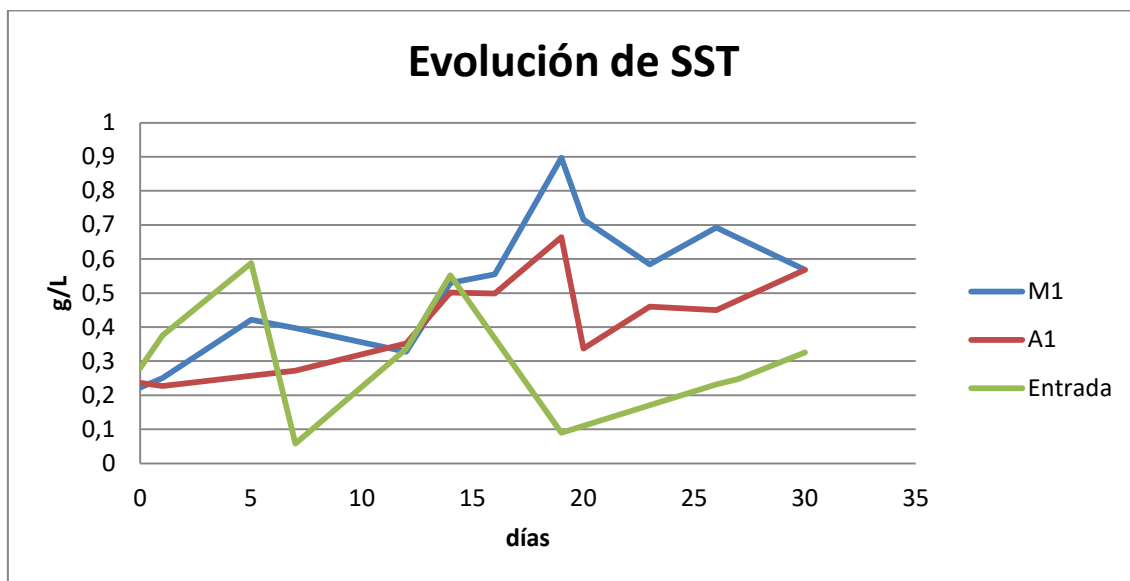


Figura 39. Evolución de los sólidos suspendidos totales para los reactores M1 y A1 y la entrada.

En la figura 39 se dibuja la evolución de los SST en los reactores M1 y A1 y en la entrada. Inicialmente tanto la entrada como los reactores tienen la misma concentración. Se observa como los valores de la entrada van oscilando entre g/L y 0,6 g/L, en cambio en los reactores la concentración va en aumento, sobretodo en M1 donde aumenta hasta 0,9 g/L, a partir de este día, la concentración en los dos reactores disminuye y parece estabilizarse en M1, pero en A1 parece que la tendencia es de aumento.

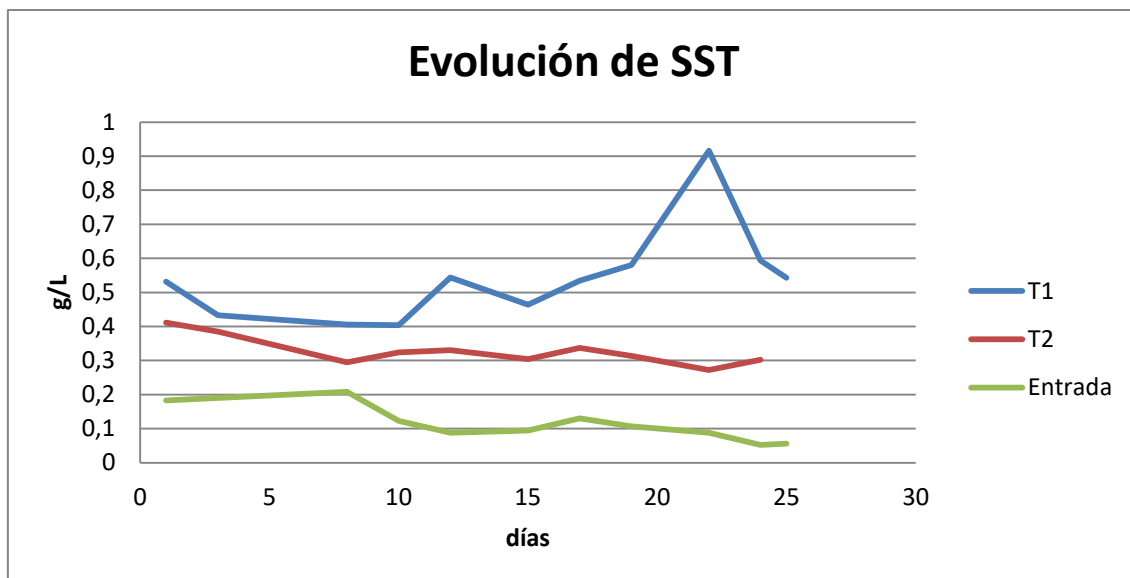


Figura 40. Evolución de los sólidos suspendidos totales para los reactores T1 y T2 y la entrada.

En la figura 40 se puede apreciar que los valores al inicio son diferentes, teniendo T1 el valor inicial más alto con más de 0,5 g/L, seguido por T2 con 0,4 g/L. La entrada inicialmente tiene un valor de casi 0,2 g/L y va decreciendo a medida que pasan los días hasta llegar por debajo de 0,1 g/L al final del experimento. Para T1 la concentración va en aumento hasta pasadas las tres semanas donde se alcanza el valor más alto con algo más de 0,9 g/L. Para T2 el valor parece estabilizarse en los 0,3 g/L.

STV

La gráfica de la evolución de STV indica la concentración que hay de algas y bacterias en el reactor

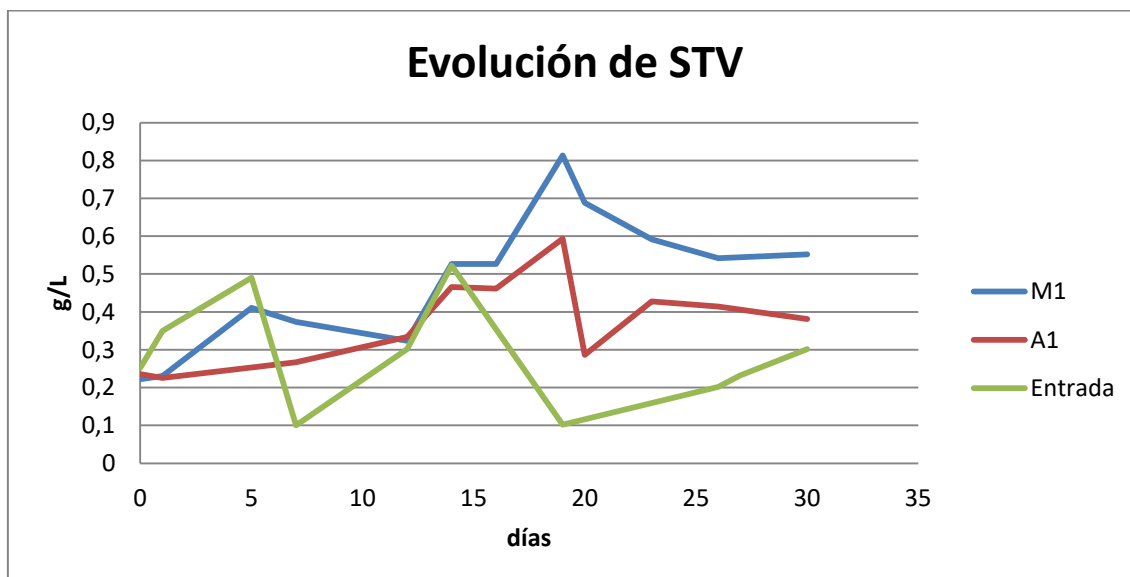


Figura 41. Evolución de los sólidos volátiles totales para los reactores M1 y A1 y la entrada.

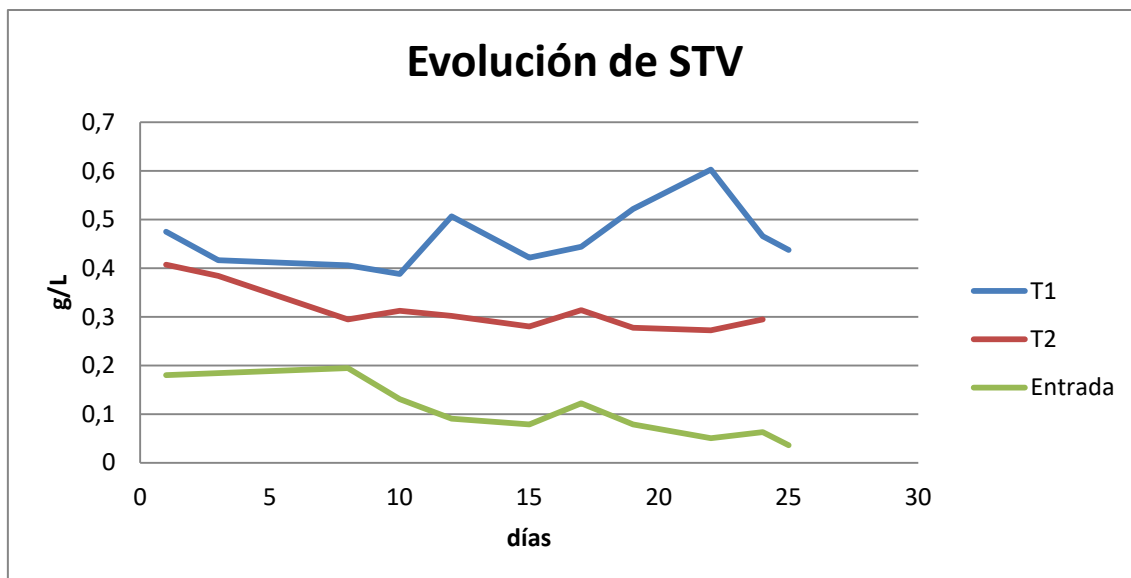


Figura 42. Evolución de los sólidos volátiles totales para los reactores T1 y T2 y la entrada.

Las tendencias seguidas por las concentraciones en M1, A1 y en la entrada que se grafican en la figura 41, son muy parecidas a las de la figura A, solo que, como es lógico, los valores son algo más bajos.

Las tendencias seguidas por las concentraciones en T1, T2 y en la entrada que se grafican en la figura 42, son muy parecidas a las de la figura 40, solo que, como es lógico, los valores son algo más bajos.

Algas

La gráfica de la evolución de la clorofila indica la concentración que hay de algas en el reactor, y la gráfica en donde el valor de la clorofila se divide entre el de STV indica el crecimiento de las algas respecto al resto de biomasa.

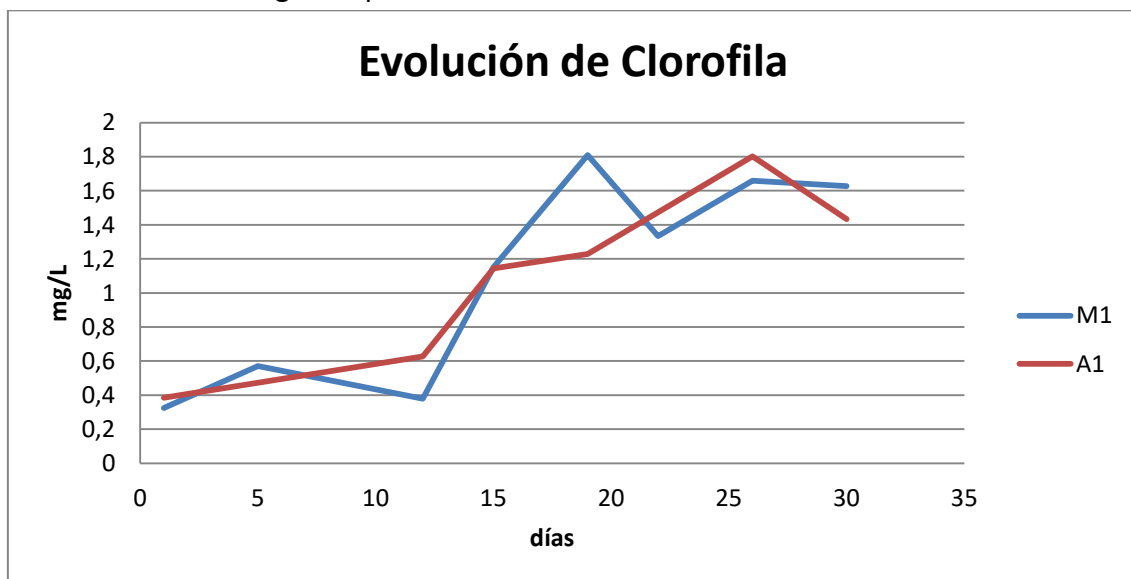


Figura 43. Evolución de la clorofila en los reactores M1 y A1.

Tal y como aparece en la figura 43 se puede observar como la concentración de clorofila va en aumento tanto para el reactor M1 como para el A1. Para el reactor M1 se observa un pico de concentración de 1,8 mg/L y después parece que se estabiliza rondando los 1,6 mg/L. Para A1 el crecimiento es constante hasta que alcanza su máximo el día 25 con 1,8 mg/L y decrece.

Para comparar el crecimiento de algas respecto al resto de la biomasa se han dividido los valores de SSV entre los de SST. De esta manera se puede analizar si la velocidad de crecimiento de las algas es la misma que la del resto del cultivo.

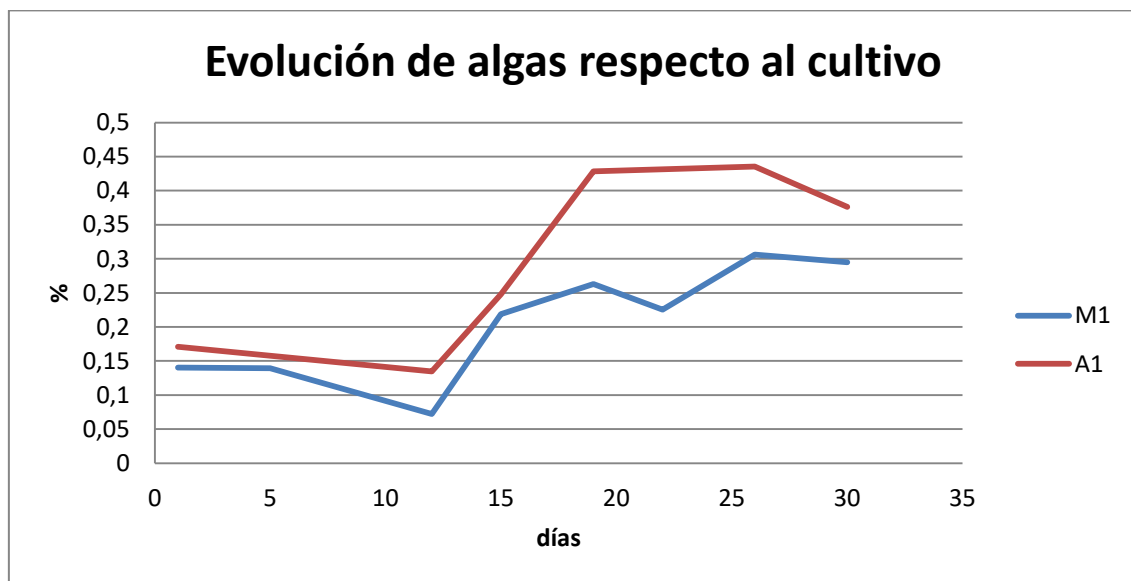


Figura 44. Evolución de las algas respecto al resto del cultivo para los reactores M1 y A1.

Se observa en la figura 44 que el crecimiento de algas no va acorde con el de bacterias en el cultivo, al principio las algas crecen en proporción 2:1000 respecto a las bacterias, que crecen mucho más rápido que las algas. Entre el día 12 y el 18 hay un aumento en la proporción de algas que indica que éstas crecen más que las bacterias. Luego este crecimiento parece que se estabiliza y vuelve a ser constante con un crecimiento en proporción 4:1000 para A1 y 3:1000 para M1.

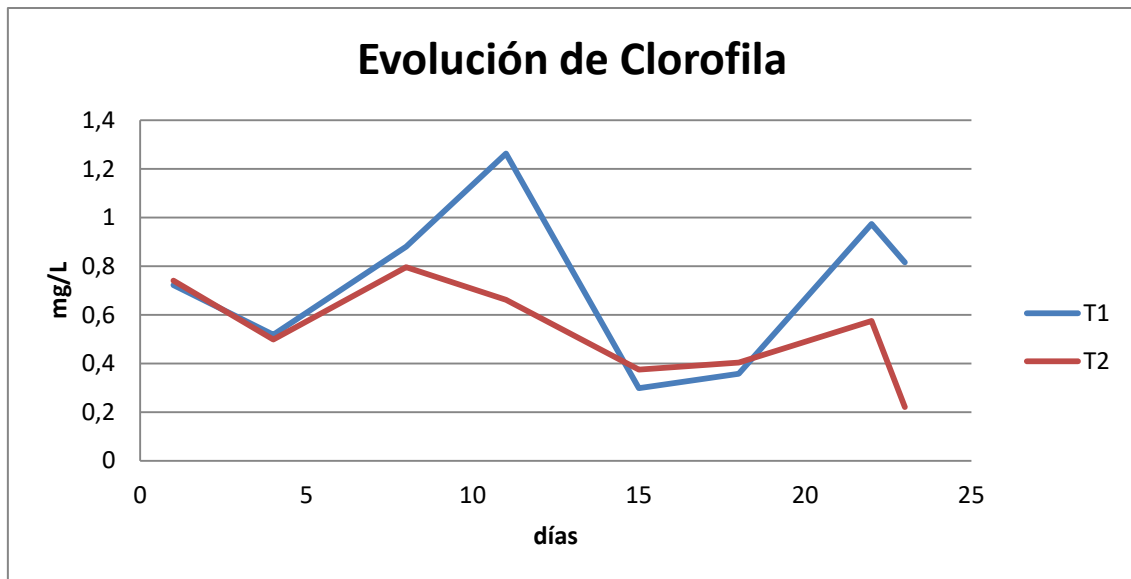


Figura 45. Evolución de la clorofila en los reactores T1 y T2.

En los reactores T1 y T2 (figura 45) las concentraciones de clorofila van oscilando. Al principio las concentraciones iniciales en los dos reactores son similares, disminuyendo su concentración al inicio del experimento. Seguidamente hay un aumento de la concentración. Para T1 este aumento llega a más de 1,2 mg/L de clorofila y disminuye de repente hasta los 0,3 mg/L, luego vuelve a aumentar hasta los casi 1 mg/L y parece que la tendencia es otra vez de decrecimiento. Para T2 el aumento de la concentración después del inicio llega a los 0,8 mg/L y decrece antes que lo haga en T1, llegando por debajo de 0,4 mg/L. Seguidamente vuelve a aumentar hasta casi los 0,6 mg/L y cae de repente hasta los 0,2 mg/L.

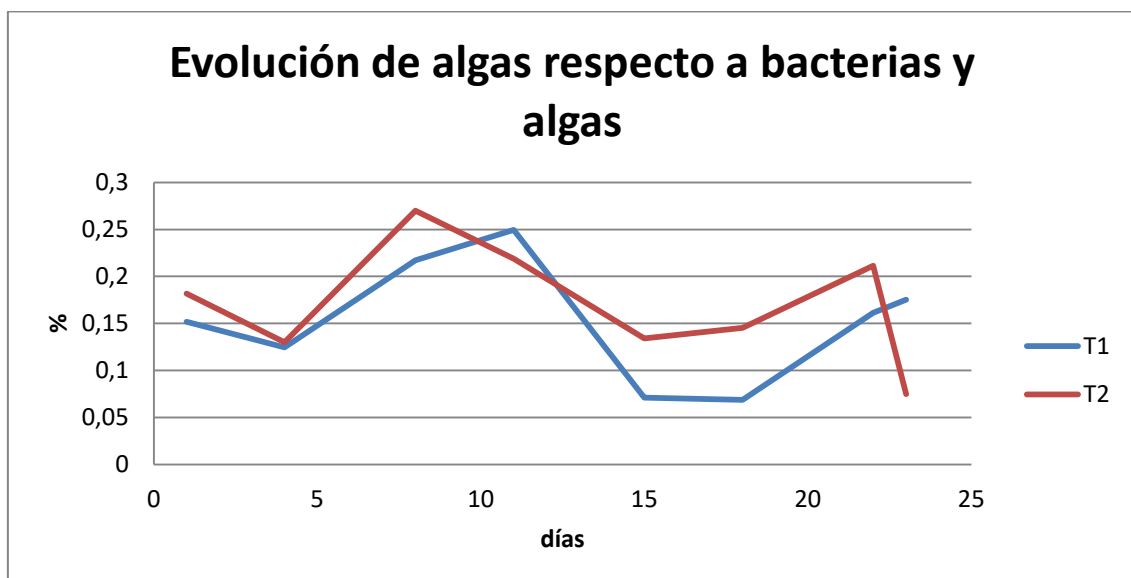


Figura 46. Evolución de las algas respecto al resto del cultivo para los reactores T1 y T2.

En la figura 46 también se observa una oscilación del crecimiento de las algas respecto a las bacterias, su crecimiento no es constante aumentando y disminuyendo su velocidad.

Los reactores M1 y A1 presentan un aumento de biomasa así como de algas. Es cierto que faltarían datos para confirmar la tendencia de estos reactores a aumentar o estabilizar esa concentración.

Producción de polímeros

Carbohidratos

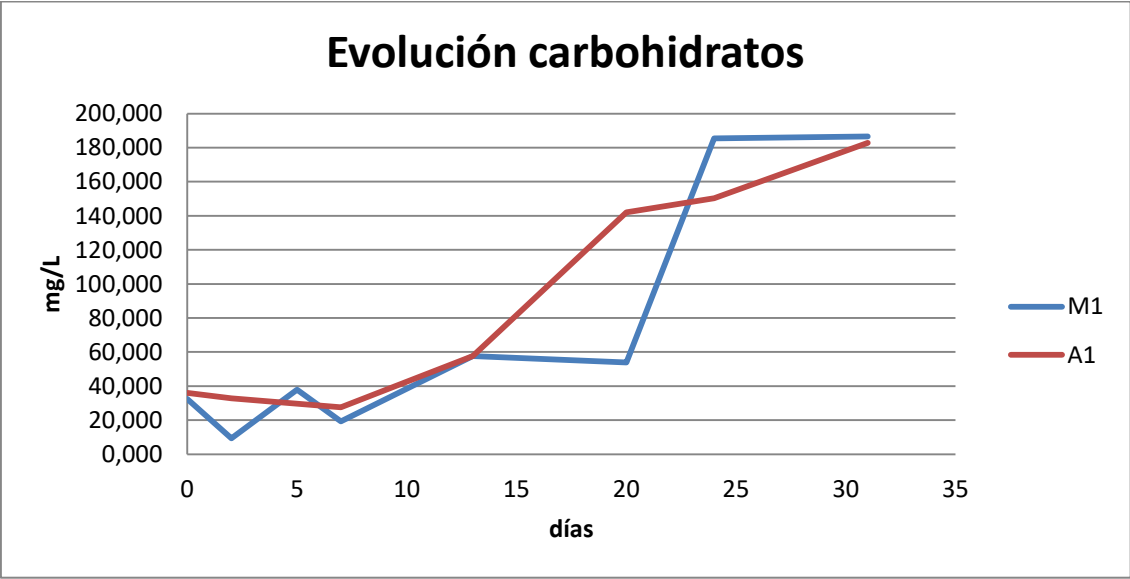


Figura 47. Evolución de carbohidratos en los reactores M1 y A1.

En la figura 47 se observa que hay un aumento de la concentración de carbohidratos en ambos reactores, si es verdad que parece que la tendencia en A1 sea un aumento más claro que para M1.

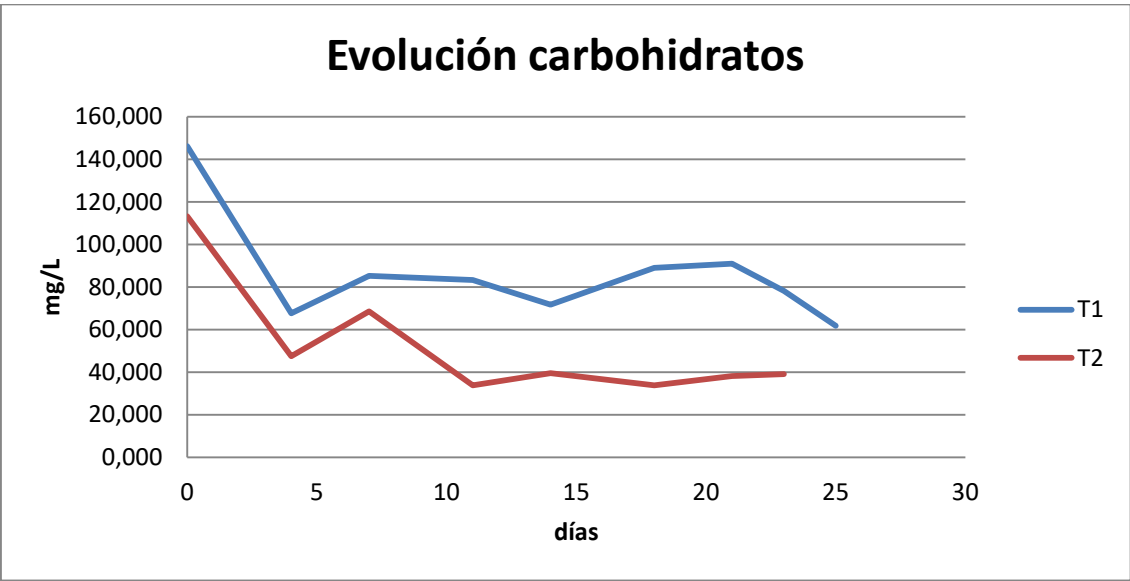


Figura 48. Evolución de carbohidratos en los reactores M1 y A1.

En la figura 48 se observa que hay una disminución de los carbohidratos para ambos reactores, más pronunciada en T2. Al inicio parten de una concentración alta en carbohidratos por encima de los 100 mg/L ambos y van decreciendo.

PHA

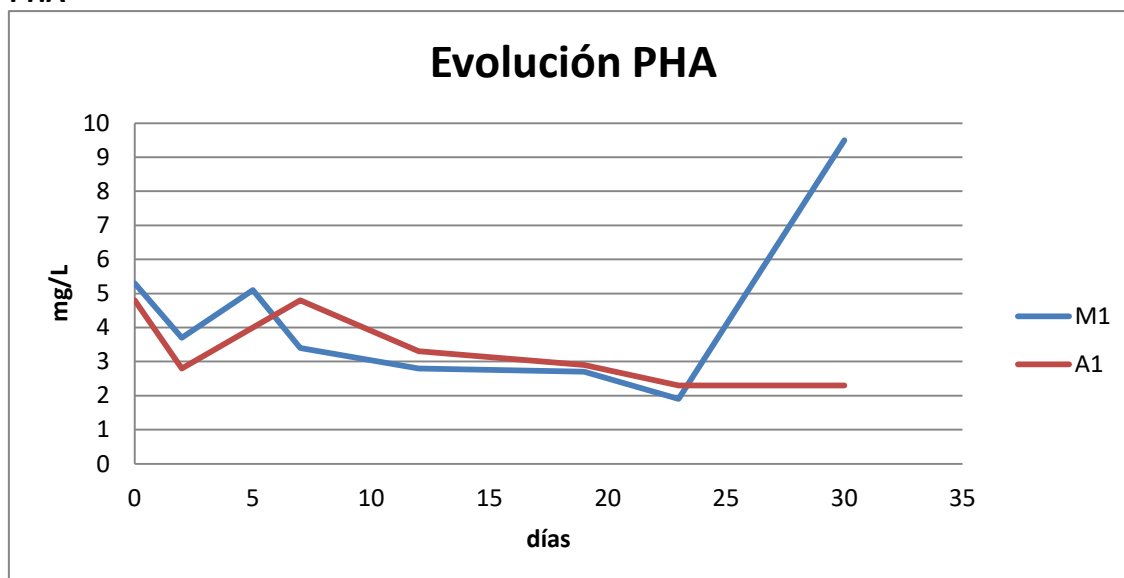


Figura 49. Evolución de PHA en los reactores M1 y A1.

En la figura 49 se aprecia como los valores de PHA van decreciendo ligeramente tanto para M1 como para A1. Es cierto que también se observa un repentino incremento, pero es muy extraño y podría tratarse de un error.

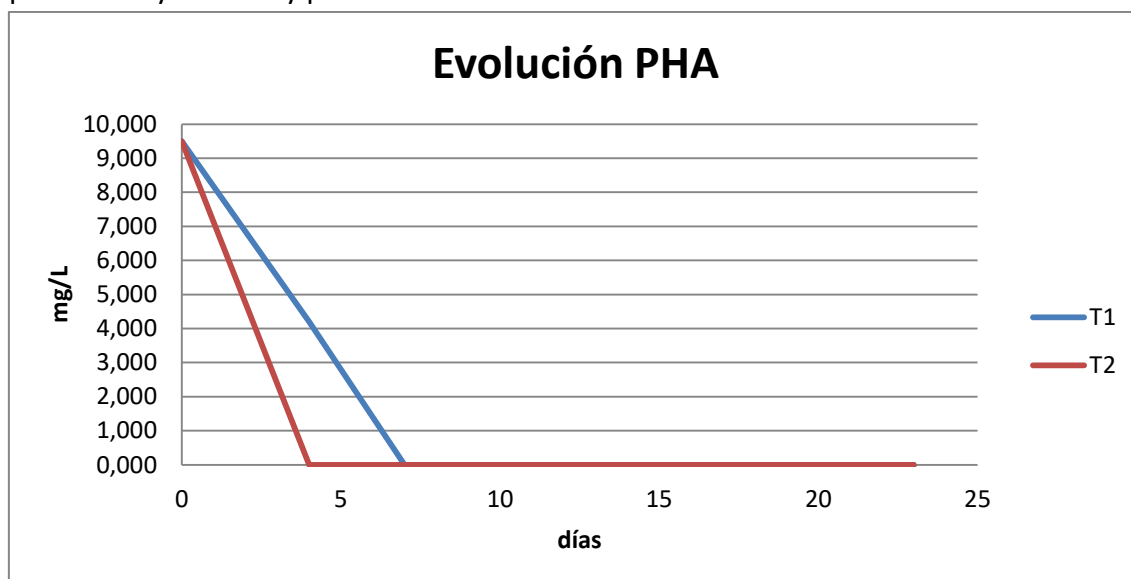


Figura 50. Evolución de PHA en los reactores T1 y T2.

En la figura 50 se muestra como para T1 y T2 los valores de PHA decrecen hasta no quedar nada.

Se concluye tanto para carbohidratos como para PHA que sus síntesis vienen favorecidas por medios limitantes en nutrientes, tal y como se demuestra con las diferencias de TRH de los diferentes bioreactores, la cual hace que la carga añadida a éstos sea mucho mayor cuanto más bajo es el valor de TRH. También se concluye que aún podrían aumentarse los TRH ya que el medio no es todo lo limitante que debiera para el continuo aumento de la concentración de PHA.

Conclusiones

Las conclusiones obtenidas a raíz del cultivo alimentado con agua residual fueron las siguientes.

Una vez observados y analizados los resultados, se concluye que cuanto más bajo es el TRH más capacidad de eliminación de DQO tiene el sistema, teniendo M1 y A1 rendimientos por encima del 90%.

La falta de datos coincidentes entre los datos de la carga de entrada y los de la concentración en la salida para M1 y A1 hacen que los valores de rendimiento obtenidos sean poco precisos y dispersos, sin poder determinar una tendencia, aunque parece que A1 obtiene mejores rendimientos de eliminación de fósforo que M1.

Para T1 y T2 las tasas de eliminación de fosforo descienden en ambos reactores, confirmando que su tiempo de retención es demasiado pequeño como para poder soportar la carga de entrada.

La falta de datos coincidentes entre los datos de la carga de entrada y los de la concentración en la salida para M1 y A1 hacen que no se pueda determinar una tendencia, aunque esta sea evidente, ya que en los gráficos de evolución del nitrógeno se observa una clara tendencia a eliminar tanto el nitrógeno orgánico como el inorgánico.

Para T1 y T2 las tasas de eliminación descienden en ambos reactores, confirmando que su tiempo de retención es demasiado pequeño como para poder soportar la carga de entrada.

Después de analizar los resultados se concluye que los reactores M1 y A1 son capaces de asimilar mejor la carga de entrada de DQO que los reactores T1 y T2 aun teniendo éstos últimos una concentración de entrada menor aunque constante durante todo el período de experimentación.

La capacidad de asimilación de TOC de T1 y T2 es mucho más notable que la de los reactores M1 y A1 como se demuestra en las figuras 25 y 26, donde se aprecia como las concentraciones en los reactores T1 y T2 no decrecen.

La capacidad de asimilación de T1 y T2 es mucho más notable que la de los reactores M1 y A1, eso puede deberse a que como en A1 y M1 hay limitación de nutrientes, la

cantidad de biomasa y sobretodo de bacterias es mucho mayor y eso hace que se consuma mucho más rápido el carbono inorgánico.

Los reactores A1 y M1 asimilan mejor el fósforo total que los T1 y T2 a igual carga de entrada, no obstante harían falta más datos para confirmar éstas tendencias de bajada.

La tendencia de eliminación de nitrógeno total en M1 y en A1 no puede ser del todo confirmada por la falta de datos, ya que solo se cuenta con dos valores para cada reactor. En cambio, se puede confirmar que los reactores T1 y T2 acumulan nitrógeno. Tanto para el nitrógeno como para el fósforo se observa como los reactores con menor tiempo de retención hidráulico tienden a acumular nutrientes en vez de asimilarlos y eliminarlos del agua de salida.

Comparando las gráficas de SST y STV (figuras 47, 48, 49 y 50) se puede observar como la gran mayoría de sólidos suspendidos son volátiles, lo que indica gran índice de materia orgánica respecto al total de sólidos tanto en la entrada como en el reactor. Observando las figuras 51, 52, 53 y 54 se observa como el crecimiento de las algas es mayor en los reactores A1 y M1 que en T1 y T2, donde su crecimiento es muy variable incluso perdiendo biomasa. Ésta pérdida puede deberse a la extracción de muestra, en la cual podría haberse perdido algo de biomasa. En todo caso, en los reactores con mayor TRH parecen ir mejor a la hora de cultivar algas.

Comparando los cuatro bioreactores (Figuras 39 y 40) se observa como para un TRH menor, la capacidad de sintetizar carbohidratos es mucho mayor. En diferencias de TRH de dos días (T1 con 8 y M1 con 10) se puede apreciar como es suficiente para crear un medio limitante en nutrientes que ayuda a promover la síntesis de carbohidratos.

Para la síntesis de PHA se observa como en los reactores M1 y A1 (figuras 41 y 42) la concentración de PHA decrece ligeramente, debida quizás a que el medio no es todo lo limitante que debiera ser y que se podría aumentar más el TRH para disminuir la carga de nutrientes de entrada. El repentino aumento de PHA para M1 puede deberse a un error en el procedimiento.

Referencias

- Abed, R. M. M., Dobretsov, S., & Sudesh, K. (2009). Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, 106(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03918.x>

- APHA, WPCF and AWWA. 1989. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 17^a ed. American Public Health Association. Washington, D.C. (5220 D)
- Arias, D. M., Uggetti, E., García-galán, M. J., & García, J. (2018). Production of polyhydroxybutyrates and carbohydrates in a mixed cyanobacterial culture : Effect of nutrients limitation and photoperiods, 42(July 2017), 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.01.001>
- Coates, R. C., Podell, S., Korobeynikov, A., Lapidus, A., Pevzner, P., Sherman, D. H., ... Gerwick, W. H. (2014). Characterization of Cyanobacterial Hydrocarbon Composition and Distribution of Biosynthetic Pathways, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085140>
- Drosig, B. (2015). Photo-autotrophic Production of Poly(hydroxyalkanoates) in Cyanobacteria. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 29(2), 145–156. <http://doi.org/10.15255/CABEQ.2014.2254>
- Flores, E., & Herrero, A. (2014). The cyanobacteria : morphological diversity in a photoautotrophic lifestyle, 1(2), 70176. <http://doi.org/10.1127/pip/2014/0008>
- Hall, D. O., Markov, S. A., Watanabe, Y., & Krishna Rao, K. (1995). The potential applications of cyanobacterial photosynthesis for clean technologies. Photosynthesis Research, 46(1–2), 159–167. <https://doi.org/10.1007/BF00020426>
- Koroleff, F. 1983. Determination of ammonia, pp. 150-157. In: Methods of Seawater Analysis, 2nd Ed.
- Kuritz, T., & Wolk, C. P. (1995). Use of filamentous cyanobacteria for biodegradation of organic pollutants (vol 61, pg 234, 1995). Applied and Environmental Microbiology, 61(3), 1169.
- Lau, N. S., Matsui, M., & Abdullah, A. A. A. (2015). Cyanobacteria: Photoautotrophic Microbial Factories for the Sustainable Synthesis of Industrial Products. BioMed Research International, 2015. <http://doi.org/10.1155/2015/754934>
- Pick, F. R., & Lean, D. R. S. (1987). The role of macronutrients (C, N, P) in controlling cyanobacterial dominance in temperate lakes. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 21(3), 425–434. <http://doi.org/10.1080/00288330.1987.9516238>
- Rao, P. H., Kumar, R. R., Raghavan, B. G., Subramanian, V. V, & Sivasubramanian, V. (2011). Application of phycoremediation technology in the

treatment of wastewater from a leather-processing chemical manufacturing facility, 37(1), 7–14.

- SÁNCHEZ, M. L. P. (2011). Químicas Y Naturales De Zaragoza Las Cianobacterias : Cooperación Versus Competencia.
- Solórzano, L. 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenol hypochlorite method. *Limnol. Oceanogr.*, 14: 799-801
- Talukder, A. H., Mahmud, S., Lira, S. A., & Aziz, A. (2015). Phycoremediation of Textile Industry Effluent by Cyanobacteria (*Nostoc muscorum* and *Anabaena variabilis*). *BioResearch Communications*, 1(2), 124–127.
- Troschl, C., Meixner, K., & Drosig, B. (2017). Cyanobacterial PHA Production—Review of Recent Advances and a Summary of Three Years’ Working Experience Running a Pilot Plant. *Bioengineering*, 4(2), 26. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020026>
- Tan, G. Y. A., Chen, C. L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I. M. N., Wang, J. Y. (2014). Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review. *Polymers*, 6(3), 706–754. <https://doi.org/10.3390/polym6030706>
- Chee, J.-Y., Yoga, S.-S., Lau, N., Ling, S., Abed, R. M. M., & Sudesh, K. (2010). Bacterially Produced Polyhydroxyalkanoate (PHA): Converting Renewable Resources into Bioplastics. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, (April 2016), 1395–1404.
- Álvarez-da Silva, L. (2016). Bioplásticos: obtención y aplicaciones de polihidroxialcanoatos, 38.
- . Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo, de desarrollo del Real Decreto-ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas.